

Gentherapie: lessen uit het verleden en een blik in de toekomst
met een focus op de Nederlandse situatie

Dr. Leonie C.M. Kaptein

Dit rapport is in opdracht van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) samengesteld. De meningen die in het rapport worden weergegeven zijn die van de auteurs en weerspiegelen niet noodzakelijkerwijs de mening van de COGEM.

Over de auteur:

Dr. Leonie C.M. Kaptein is in 1997 gepromoveerd op onderzoek van retrovirale vectoren in het bijzonder voor toepassing bij beenmerggentherapie en is voor de studie met betrekking tot dit rapport aangesteld als post-doc bij de afdeling Moleculaire Celbiologie, laboratorium voor Virusbiologie (onder leiding van prof.dr. Rob C. Hoeben) van het Leids Universitair Medisch Centrum.

Inhoudsopgave

Summary	5
Samenvatting	11
Verantwoording rapport	17
1 Getherapie	19
1.1 Inleiding	19
1.2 Vectortechnologie	19
1.3 Non-virale vectoren	21
1.4 Virale vectoren	22
1.4.1 RNA virussen	22
1.4.2 DNA virussen	24
2 Klinische studies	27
2.1 Inleiding	27
2.2 Resultaten tot nu toe	29
2.3 Virotherapie	31
2.4 Klinische studies Nederland	33
2.5 Regulatorie kwesties	35
3 Nieuwe ontwikkelingen	37
3.1 Trends onderzoeksontwikkelingen	37
3.2 Vectortechnologie	38
3.2.1 Non-virale vectoren	38
3.2.2 Virale vectoren	40
3.3 Genetische achtergrond	44
3.4 Systemische productie van therapeutische eiwitten	45
3.5 Monogene ziekten	45
3.6 Kanker	46
3.7 Neurologische aandoeningen	47
3.8 Overige aandoeningen	47
3.9 Overige ontwikkelingen	49
4 Risico analyse	53
4.1 Risico analyse leukemie bij X-SCID-patiënten	53
4.2 Globale risico analyse	56

4.2.1 Insertiemutagenese	56
4.2.2 Transgen	57
4.2.3 Interacties met immuunsysteem	58
4.2.4 Vectorontwikkelingen	58
4.2.5 Combinatie van therapieën	61
4.2.6 Shedding en kiembaantransductie	61
4.2.7 Diermodellen	62
4.2.8 Risico's bestaand naast gebruikte technologie	63
4.2.9 Slotopmerkingen	64
5 Aandachtspunten	65
5.1 Factoren direct relevant voor risico voor mens en milieu	65
5.2 Overige risicofactoren	68
5.3 Ondersteuning voor risico analyse	70
5.4 Aandachtspunten Nederland	71
5.6 Overzichtstabel met besproken thema's	72
Bijlagen	
Lijst geïnterviewden	77
Referenties	78
Relevante publicaties met betrekking tot gentherapie in Nederland	83
Tabel Nederlandse klinische gentherapiestudies	84
Regulatoire reacties op ontstaan van leukemie bij X-SCID patiënten	85

Gene therapy: lessons from the past and prospects for the future

with a focus on the Dutch situation

Summary with keypoints for the future

This report was written by request of the Netherlands Committee on Genetic Modification (COGEM) with the aim to give an overview of the state of the art of gene therapy and to indicate trends for the future in order to anticipate on factors that are relevant for the assessment of risks for human health and the environment. In addition to a literature study, Dutch gene therapy experts were interviewed. Their input to this report was highly appreciated.

Originally, the concept of gene therapy was developed for the treatment of (monogenic) inherited deficiencies. Nowadays, gene therapy is also applied for the treatment of cancer, infectious diseases, vascular diseases and other acquired and multigenic diseases. Since the start in 1989, worldwide more than 5000 patients have been treated by gene therapy so far. In 2000, the first article was published in which cure by gene therapy was described. In general, clinical gene therapy appeared to be safe to the patient with only mild side effects. However, there were some setbacks. In 1999 a patient died a few days after receiving an adenoviral vector. A few years later this incident was followed by the occurrence of leukemia in two patients as a consequence of insertional mutagenesis by integration of a retroviral vector. In order to anticipate on new developments several factors that are relevant for the assessment of risks for human health and the environment are listed below. Furthermore, points of interests for the Dutch situation are mentioned at the end.

Factors considered to be relevant for risk assessment for man and environment

(Genetic) modification of viral vector tropism

The use of vectors with a modified tropism by (genetic) modification of the vector itself is increasing. The aim is to increase the specificity of the gene delivery, thereby reducing possible side effects, and (in the future) possibly to apply systemic delivery. In order to carry out risk analyses for the use of viral vectors, it is not (always) possible to use the current knowledge and understanding of the properties of the parental virus only.

Therefore, it is advisable to get an overview of all the developments and possible consequences of vector tropism modifications. Special attention should be paid to vectors that have tropism modification anchored in the viral genome and to the possible risks of the occurrence of recombination with wild type viruses.

Selective replication of viral vectors

In order to make cancer gene therapy more effective, selectively replicating viral vectors are being developed and applied. The ability to selectively replicate in cancer cells may not only determine the success of the treatment, but may also influence possible risks of adverse side effects. A consequence of the use of such vectors could be an increased incidence of shedding.

Therefore, it is advisable to analyze and to follow new developments of different strategies of selective replication of viral vectors and to test them in (animal) model systems in order to determine the occurrence of shedding and other possible effects.

Evasion of the immune system

Viral vectors can exert their effect longer when they persist in the patient. Initially this was accomplished by systemic immune suppression. New vector technologies open the way for a more specific reduction of the immune response against the virus by hiding the vector from the immune system. In general, reduction of immunogenicity may lead to (prolonged) persistence of such vectors. Improving the efficacy of such vectors combined with selectively replicating abilities could possibly increase the risk of shedding.

In order to assess the possible risks for human health and the environment, it is advisable to closely follow developments in vector design for escaping from the immune system.

Combination of therapies

After demonstrating the concept of gene therapy and determining the safety of gene therapy vectors, a next step is to improve the efficacy of gene therapy. One of the options is to combine different therapies. It is important to realize that risks associated with gene therapy are not determined by the particular vector only, but also by the context in which the vector is used. For example, chemotherapy or radiotherapy can influence the immune status of the patient and result in the persistence of viral vectors.

Risk analyses should take into account the combined application of different therapies since they can influence the behavior of viral vectors.

Shedding

So far, the consequences of the introduction of gene therapy vectors into the environment by shedding from patients are considered to be limited and acceptable. Still, actual data on the extent of vector shedding are hard to find and/or have not (always) been systematically analyzed in the past.

It is advisable to stimulate the analyses of shedding data and to collect them in a central and accessible way in order to facilitate future risk analyses.

Germline transmission

Up to now, two clinical studies have reported the presence of vector sequences in sperm at early timepoints after gene therapy.

With the generation of new gene therapy vectors germline transmission will remain an important issue.

Other risk factors

The themes mentioned are mainly relevant for the assessment of the safety of the patient. However, in the case where a viral vector would be introduced in another person than a patient the themes become also relevant for risk assessment for the environment.

Insertional mutagenesis

The risk of insertional mutagenesis is not a hypothetical risk anymore. Insertional mutagenesis is a realistic, albeit small risk for the consequences for the safety of the patient. Furthermore, there is a trend to modify originally non-integrating vectors by introducing integration properties. Since there is also an obvious advantage of integrating vectors; they will persist in the transduced cells and their progeny.

Possibilities to reduce the risk of insertional mutagenesis in the future are becoming more clear. However, new vectors are being designed with newly introduced integration capabilities. Therefore, it is advisable to closely follow further developments in the field of vector integration.

Transgene

Now that gene therapy vectors are becoming increasingly safe (eg. by the improvement of production methods), the influence (and safety aspects) of the transgene will become more relevant.

Like for every other medicine there is an optimal dosage for gene therapy vectors. The risk of overdosage is a realistic possibility. Possible side effects of the protein expressed by the transgene is not necessarily inherent to the gene therapy procedure itself.

Background patient

The physical condition and genetic constitution of the patient play a role in the efficacy of a therapy. This also concerns gene therapy.

In the short term, knowledge is still lacking for the application with clinical gene therapy studies. In the long term, insight in the (genetic) constitution of the patient will lead to more effective and safer therapies.

Support for risk analysis

The topics mentioned can be used to support future risk analyses and it is advisable to stimulate the development of such tools. Eventually the obtained results will be of benefit for all parties involved in gene therapy, ranging from researcher to patient and from advisory committee to commercial company.

Animal models

Despite evaluation of experimental strategies in animal models, the adverse side events (the occurrence of leukemia in two patients after retroviral insertion mutagenesis) were not foreseen. Animal models have their limitations.

Therefore, further development and optimization of relevant animal models remain important for testing the efficacy and determining the possible risks of new therapies.

Databanking

Risk analyses are only possible when relevant data are generally accessible. Therefore the set up and further development of databanks (such as data on efficacy and side effects, viral

insertion sites, shedding data, et cetera) are indispensable for the further development of gene therapy in a clinical setting, as well as (viral) gene transfer as a technology platform.

Practical issues that will hamper comparison of data sets are the diversity of viral vector design and production.

Government may play an important role to collect such data. It is advisable to pursue an active policy at international level for standardization of methods, collecting various data and making them generally accessible.

Points of interests for the Dutch situation

The topics mentioned will be of importance for facilitating gene therapy studies in the Netherlands. Furthermore, this could also improve the position of Dutch gene therapy studies in comparison to other countries.

(International) accessibility data gene therapy studies

Information on Dutch clinical gene therapy protocols (34 in total by the end of 2003) can be extracted from the VROM website. However, more organizations could provide relevant information. At this time information on current gene therapy studies, principle investigator, number of enrolled patients are difficult to obtain.

The exchange of information with other countries should be stimulated. This could be achieved by providing more information in English (thereby making Dutch gene therapy studies more visible to the rest of the world) and by stimulating European harmonization of legislation on clinical gene therapy studies (thereby facilitating international collaboration).

Financing

The development of gene therapy for many applications will be dependent on academic research. This year the Netherlands Organisation for Health Research and Development (ZonMw) has allocated a budget of 15.8 million euro for the coming years to be assigned for translational gene therapy studies, indicating the importance of development of this field.

Experimental gene therapy is relatively expensive. The minimal costs for safety tests on viral vector batches are high. However, after proving being a safe alternative, gene therapy could significantly reduce the costs of e.g. enzyme replacement therapies.

Samenvatting met aandachtspunten voor de toekomst

Dit rapport is geschreven in opdracht van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) met als doel om de stand van zaken op het terrein van de genterapie weer te geven en nieuwe trends te signaleren om op deze manier te kunnen anticiperen op factoren die relevant zijn voor risico analyses voor mens en milieu. Naast de uitvoering van een literatuurstudie, zijn er interviews gehouden met Nederlandse genterapiedeskundigen. Zij hebben een waardevolle bijdrage geleverd aan dit rapport.

Oorspronkelijk was het genterapieconcept ontwikkeld voor de behandeling van aangeboren deficiënties. Tegenwoordig wordt genterapie ook toegepast bij andere aandoeningen zoals kanker, infectieziekten, hart- en vaatziekten en andere verworven en multigene ziekten. Sinds de start in 1989 zijn er tot nu toe wereldwijd meer dan 5000 patiënten met genterapie behandeld. In 2000 is de eerste publicatie verschenen waarin de klinische effectiviteit van genterapie werd aangetoond. Over het algemeen bleek de toepassing veilig voor de patiënt met voornamelijk milde bijwerkingen. Toch waren er ook tegenslagen. In 1999 overleed een patiënt kort na een toediening van adenovirale vector. Een paar jaar na dit incident werd leukemie vastgesteld bij twee patiënten als gevolg van insertiemutagenese door integratie van de retrovirale vector. Om te kunnen anticiperen op nieuwe ontwikkelingen zijn verschillende factoren die relevant zijn voor de beoordeling van de risico's voor mens en milieu op een rij gezet. Tot slot worden nog een aantal aandachtspunten voor de Nederlandse situatie genoemd.

Factoren direct relevant voor risico voor mens en milieu

(Genetische) modificatie van het tropisme van virale vectoren

Het gebruik van vectoren waarvan het tropisme veranderd is door (genetische) modificatie van de vector is de laatste jaren sterk toegenomen. Hiermee wordt getracht om onder andere de specificiteit van genafgifte te verhogen. Bij het maken van risico analyses is het niet altijd (meer) mogelijk om zich te baseren op de bestaande kennis van en inzicht in de eigenschappen van het uitgangsvirus.

Het is zinvol om de ontwikkelingen en mogelijke consequenties op het gebied van modificatie van het vectortropisme verder in kaart te brengen. Speciale aandacht hierbij verdienen vectoren waarbij de modificatie van het tropisme in het virale genoom verankerd ligt en het mogelijke risico van optreden van recombinatie met wild type virussen.

Selectieve replicatie van virale vectoren

Om kanker effectiever te behandelen worden selectief replicerende virale vectoren ontwikkeld. Het verhogen van de efficiëntie van deze vectoren om selectief in kankercellen te kunnen vermenigvuldigen is zowel bepalend voor de kans op succes als voor het risico op bijwerkingen. Het gebruik van deze vectoren kan leiden tot verhoogd optreden van shedding. Het is raadzaam de verschillende strategieën van selectieve replicatie van virale vectoren te analyseren en nauwlettend te volgen, alsook te testen in (dier)modelsystemen zodat het optreden van shedding en andere effecten bepaald kunnen worden.

Ontsnapping aan het immuunsysteem

Virale vectoren kunnen langer effectief zijn indien zij kunnen persisteren in de patiënt. Aanvankelijk werd dit bereikt door systemische immuunsuppressie. Nieuwe vectortechnologieën maken het mogelijk om meer specifiek de immuunrespons tegen het virus te beperken waardoor de vector minder zichtbaar wordt voor het immuunsysteem. Door de reductie van de immunogeniteit van de vectoren zullen deze langer persisteren. Verbetering van de effectiviteit van dergelijke vectoren in combinatie met selectief replicerende vermogens kan mogelijk het risico op shedding vergroten. Het verdient aanbeveling deze ontwikkelingen nauwlettend te volgen, zodat de mogelijke risico's voor mens en milieu bepaald kunnen worden.

Combinatie van therapieën

Na de eerste demonstratie van het gentherapie concept en het bepalen van de veiligheid van gentherapievectoren is een volgende stap het verbeteren van de effectiviteit van gentherapie. Een van de opties is om gentherapie te combineren met andere therapieën. Het is belangrijk om te realiseren dat risico's van gentherapie niet alleen worden bepaald door de betreffende vector, maar ook door de context waarin deze gebruikt wordt. Door bijvoorbeeld chemotherapie of radiotherapie kan het gedrag van virale vectoren in de patiënt beïnvloed worden.

Bij risicoafwegingen dienen ook de effecten van het combineren van therapieën meegenomen te worden, aangezien zij het gedrag van virale vectoren kunnen beïnvloeden.

Shedding

De gevolgen van de introductie van gentherapievectoren in het milieu door het optreden van shedding vanuit de patiënt zijn vooralsnog beperkt en worden aanvaardbaar geacht. Feitelijke

gegevens over de mate van optreden van vector shedding zijn slechts in beperkte mate openbaar en niet altijd systematisch geanalyseerd.

Het verdient aanbeveling om sheddingdata centraal en toegankelijk op te slaan om zo betere risico analyses mogelijk te maken.

Kiembaantransmissie

Tot op heden zijn er twee klinische studies gemeld waarbij vectorsequenties in het sperma op vroege tijdstippen na gentherapie aangetoond waren.

Met de ontwikkeling van nieuwe gentherapievectoren zal kiembaantransmissie een belangrijk onderwerp blijven.

Overige risicofactoren

De genoemde onderwerpen zijn met name van belang bij de beoordeling van de veiligheid van de patiënt. Echter, in het geval dat een virale vector geïntroduceerd wordt in een andere persoon dan een patiënt zijn deze onderwerpen ook relevant voor risico analyses voor het milieu.

Insertiemutagenese

Het risico op insertiemutagenese is niet meer een slechts hypothetisch risico. Er bestaat een reëel, zij het klein, risico op consequenties voor de veiligheid van de patiënt. Bovendien is er een trend waarbij van oorsprong niet-integrerende vectoren voorzien worden van integrerende eigenschappen. Reden hiervoor is het voordeel van integrerende vectoren, op deze manier blijft het transgen immers aanwezig in de getransduceerde cellen en de dochtercellen. Mogelijkheden om het risico op insertiemutagenese en in de toekomst te beperken zijn helderder geworden. Tegelijkertijd worden er nieuwe vectoren ontwikkeld met nieuw integrerende eigenschappen, derhalve verdient het aanbeveling om verdere ontwikkelingen op het gebied van vectorintegratie nauwlettend te volgen.

Transgen

Bij het steeds veiliger maken van gentherapievectoren (onder andere door het verbeteren van productiemethoden) komt de rol en de veiligheidsaspecten van het gebruikte transgen meer naar voren.

Zoals voor elk medicijn bestaat er bij genterapievectoren een optimale dosis. Het risico van overdosering is reëel aanwezig.

Achtergrond patiënt

De conditie en (genetische) constitutie van de patiënt spelen een rol bij de effectiviteit van een therapie. Dit geldt ook voor genterapie.

Op de korte termijn ontbreekt de kennis om hiermee rekening te houden bij het uitvoeren van klinische genterapiestudies. Op de langere termijn zal inzicht in de (genetische) constitutie van de patiënt leiden tot effectievere en veiligere therapieën.

Ondersteuning voor risico analyse

De genoemde onderwerpen zijn van belang bij het onderbouwen van toekomstige risico analyses. Het zou raadzaam zijn om de ontwikkeling van dergelijke hulpmiddelen verder te stimuleren. Vanzelfsprekend zullen de uiteindelijke resultaten van dergelijke ondersteuning ten goede komen van eigenlijk alle betrokken partijen bij genterapie. Van onderzoeker tot patiënt en van vergunningsverlenende instantie tot commercieel bedrijf.

Diermodellen

Ondanks het evalueren van de te gebruiken strategie in diermodellen, waren de opgetreden incidenten (het optreden van leukemie bij twee patiënten ten gevolge van retrovirale insertiemutagenese) niet voorzien. Diermodellen hebben hun beperkingen.

Het verder ontwikkelen en optimaliseren van relevante diermodellen is onverminderd belangrijk voor het testen van effectiviteit en het bepalen van mogelijke risico's die nieuwe therapieën met zich mee kunnen brengen.

Databanken

Goede risico analyses zijn alleen mogelijk indien relevante data algemeen toegankelijk zijn. Daarom is het opzetten en verder ontwikkelen van databanken (zoals gegevens over effectiviteit en bijwerkingen, virale insertieplaatsen en shedding) onmisbaar voor enerzijds verdere ontwikkeling van genterapie als klinisch toepasbare entiteit, en anderzijds voor (virale) genoverdracht vectoren als technologieplatform. Praktische kanttekeningen hierbij betreffen de diversiteit van virale vectorontwerpen en productiemethoden, dit zal de vergelijking van grote datasets bemoeilijken.

De overheid kan een belangrijke rol spelen in het verzamelen en het centraal beschikbaar stellen. Het verdient aanbeveling op internationaal niveau een actief beleid te voeren om methoden te standaardiseren, verschillende data te verzamelen en algemeen beschikbaar te stellen.

Aandachtspunten Nederland

De genoemde onderwerpen zijn met name van belang om genterapieonderzoek in Nederland te faciliteren. Bovendien kan door stimulering van genoemde onderwerpen Nederland zich in het genterapieveld duidelijker profileren naar de rest van de wereld.

(Internationale) toegankelijkheid data genterapiestudies

Informatie over Nederlandse klinische genterapieprotocollen (34 in totaal, eind 2003) is vooralsnog alleen te extraheren van de VROM website, terwijl meerdere organisaties relevante informatie toegankelijk zouden kunnen maken. Op dit moment is informatie over lopende genterapiestudies, verantwoordelijke onderzoekers, aantallen deelnemende patiënten moeilijk te achterhalen.

De uitwisseling van informatie met het buitenland dient gestimuleerd te worden. Dat kan enerzijds door meer informatie in het Engels aan te bieden (zodat Nederland duidelijker op de genterapeutische wereldkaart geplaatst wordt), anderzijds door verdere Europese harmonisatie van regelgeving van klinische genterapiestudies (waardoor internationale samenwerking vergemakkelijkt wordt).

Financiering

De ontwikkeling van genterapie voor veel toepassingen zal nadrukkelijk afhankelijk zijn van academisch onderzoek. ZonMw heeft in het programma Translationeel Genterapeutisch Onderzoek tot 2013 in totaal 15,8 miljoen euro beschikbaar voor translationele genterapiestudies. Dit geeft aan dat de verdere ontwikkeling van klinische genterapiestudies in Nederland gestimuleerd wordt.

Experimentele genterapie is relatief duur. De productiekosten van virale vectorbatches zijn hoog, alleen met toenemende patiëntenaantallen zullen de kosten per patiënt significant kunnen afnemen. Op de lange termijn kan genterapie mogelijk kostenbesparend zijn bij bijvoorbeeld enzymvervangingstherapieën. Dit geldt vanzelfsprekend op voorwaarde dat eerst is laten zien dat genterapie een veilig alternatief is voor de huidige therapie.

Verantwoording rapport

Dit rapport is geschreven in opdracht van de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) met als doel om de stand van zaken op het terrein van de genterapie weer te geven en nieuwe trends te signaleren. De COGEM is een adviesorgaan dat onder andere adviseert over de uitvoering van genterapiestudies met betrekking tot kwesties omtrent de veiligheid van mens en milieu, daarom is er in dit rapport met name aandacht besteed aan mogelijke risicofactoren voor mens en milieu. Hierbij wordt ingegaan op lessen die geleerd kunnen worden uit het verleden en vooruitgekeken naar nieuwe ontwikkelingen. Om een zo volledig mogelijk beeld te krijgen, is naast een literatuurstudie ook een analyse gemaakt van internationale rapporten op het terrein van (risico analyses van) genterapie. Zeer belangrijke informatie is echter verkregen door het houden van interviews met Nederlandse genterapiedeskundigen. Hierbij is gekozen voor een benadering van verschillende toepassingsgebieden (kanker, hematologie, neurologie, monogene ziekten) van genterapie, alsook belicht vanuit verschillende functies (fundamenteel of toegepast onderzoeker, arts, apotheker), uit zowel de academische hoek als het bedrijfsleven. De lijst van geïnterviewden staat vermeld in de bijlage. Hierbij wil ik hartelijk dankzeggen voor de waardevolle bijdragen van de geïnterviewden, hun enthousiasme om hun kennis en ervaringen te delen en de Nederlandse situatie toe te lichten. Tijdens deze studie is tweemaal overleg geweest met de begeleidingscommissie vanuit de COGEM (dr. H. Schellekens, mw.dr. G.A.P. Hospers, drs. D. Louz en dr. D.A. Bleijs) met betrekking tot de focus en invulling van dit rapport. Verder heb ik dankbaar gebruik gemaakt van de gastvrijheid van het Virusbiologie lab onder leiding van prof.dr. Rob C. Hoeben (Moleculaire Celbiologie, Leids Universitair Medisch Centrum). Het is altijd goed van zoveel mogelijk verschillende kanten reacties te krijgen en fijn om bij praktische problemen hulp te ontvangen. Mijn speciale dank gaat uit naar Rob voor de inspirerende begeleiding bij deze studie.

1 Genterapie

1.1 Inleiding

Met de waarneming dat ratten DNA in polyomavirussen kon worden ingepakt werd het theoretisch mogelijk om ziekten bij, of meer letterlijk *in*, de kern te gaan aanpakken. In plaats van patiënten (telkens) een eiwit of enzym toe te dienen, zou het nu mogelijk kunnen worden dat patiënten (eenmalig) het benodigde gen verwerven zodat zij zelf (levenslang) het ontbrekende eiwit kunnen aanmaken. De ontwikkeling van een techniek om naakt DNA efficiënt in een cel te krijgen vond plaats in 1973 via calciumfosfaatprecipitatie door Graham en van der Eb in Leiden. Tegenwoordig wordt voor genoverdracht veel gebruik gemaakt van een meer efficiëntere methode, namelijk door middel van virussen. In 1989 kreeg de eerste patiënt een gen via een replicatie-deficiënt retrovirus toegediend. De technische mogelijkheden om genen in cellen te introduceren worden steeds uitgebreider. Een overzicht van huidige vectoren voor genterapie wordt gegeven in *Tabel 1*.

Genterapie is in eerste instantie ontwikkeld met het doel om monogene recessieve ziekten te kunnen genezen. Dit is echter vrij snel uitgebreid naar kanker en later ook naar infectieziekten (AIDS) en multifactoriële aandoeningen (cardiovasculaire ziekten). In 1991 is er in Nederland de eerste vergunning voor 'Introductie in het Milieu' ten behoeve van een klinisch genterapieprotocol afgegeven en inmiddels zijn dit er 34 in totaal. Hiervan zijn ca. 20 protocollen daadwerkelijk gestart.

De haalbaarheid van het ideale genterapieconcept, namelijk een methode waarbij een defectief gen wordt vervangen door het correcte gen, is door Capecchi in 1989 beschreven. Maar door de zeer lage efficiëntie van deze methode is deze nog niet geschikt voor klinische toepassing.

1.2 Vectortechnologie

Bij het ontwikkelen van vectoren voor genterapie is er - onafhankelijk van het type vector - een aantal punten waaraan gewerkt wordt om de effectiviteit van vectoren te optimaliseren. Er wordt onder andere gewerkt aan het verhogen van de transductie-efficiëntie, door het verhogen van de virustiter of door specifieke cel- of weefseltransductie te bewerkstelligen, het reguleren van expressie en het beïnvloeden van interacties met, of het ontsnappen aan, componenten van het immuunsysteem. Daarnaast wordt getracht te voorkomen dat replicatie-

Tabel 1. Vectortypen voor gentherapie [Kohn *et al.*, 2003].

Vectortype	Insertieruimte	Integratie	Persistentieduur
Non-viraal			
Oligonucleotiden, decoys, antisense, ribozymen, siRNAs	10-100 bp	nee	uren-dagen
Expressieplasmiden	2-50 kb	extreem zeldzaam	dagen
Transposons	2-10 kb	efficiënt, relatief willekeurig	stabiel
Integratie plasmiden met bacteriofaag integrasen	2-10 kb	efficiënt, plaatsspecifiek	stabiel
Kunstmatige chromosomen	50-300 kb	episomaal	+/- stabiel
Virale vectoren			
Retrovirussen	2-6 kb	efficiënt, relatief willekeurig	stabiel
Lentivirussen	2-6 kb	efficiënt, relatief willekeurig	stabiel
Adenovirussen	2-30 kb	nee	weken-maanden
Adenogeassocieerde virussen	2-5 kb	zeldzaam	maanden-jaren
Herpesvirussen	2-40 kb	episomaal	maanden-jaren

bp: baseparen; kb: kilobasen

competente virussen ontstaan tijdens de productie door het verbeteren van de productiecellijnen.

Voor toepassingen bij kankertherapie wordt ook gewerkt aan betere verspreiding van het transgen of het transgenproduct binnen de tumor. Een eerste variant hiervan staat bekend als het 'bystander effect'. Het in de tumorcel ontstane toxische metaboliet diffundeert naar buurcellen, zodat ook niet getransduceerde cellen gedood kunnen worden. Een tweede, meer actieve variant is tumor selectieve replicatie van de virale vector. De gebruikte virale vector kan na transductie van een tumorcel gaan repliceren. Op deze manier wordt de lokale

virusconcentratie in een tumor verhoogd, terwijl na transductie van een normale cel er geen virusreproductie kan optreden. Daarnaast bestaan er diverse strategieën die er op gericht zijn om een immuunreactie tegen tumorcellen te induceren.

Hieronder volgt er een overzicht van non-virale en virale vectoren die gebruikt worden voor genterapie. In hoofdstuk 3 staat een korte bespreking van onderzoekstrends. Voor meer gedetailleerde beschrijvingen van andere virale vectoren wordt hier verwezen naar enkele overzichtsartikelen [Nemunaitis & Edelman, 2002, Varghese & Rabkin, 2002; Russell, 2002].

1.3 Non-virale vectoren

De non-virale genoverdrachtsystemen bestaan uit een heterogene groep van methoden, waaronder ‘naakt’ DNA, DNA ingepakt in liposomen en DNA-eiwit complexen [Niidome & Huang, 2002, Schmidt-Wolf & Schmidt-Wolf, 2003, Lipps *et al.*, 2003]. DNA kan aan verschillende cellen en weefsels *in vitro* en *in vivo* worden toegediend. Overdracht van naakt DNA *in vitro* kan bijvoorbeeld uitgevoerd worden door middel van calciumfosfaat transfectie, lipofectie, electroporatie of micro-injectie. Overdracht van naakt DNA *in vivo* kan plaatsvinden door directe injectie of door gebruik te maken van een zogenoemd “genpistool” dat met DNA gecoate partikels onder hoge druk bombardement in weefsel inbrengt. Liposomen – zelf-assembling fosfolipide dat aggregeert met het therapeutische DNA – zijn veilig gebleken bij *in vivo* genterapie. Lipiden kunnen celmembranen passeren door efficiënte fusie met celmembranen of door endocytose waarna het DNA in de cel vrijkomt. Verschillende *in vivo* toepassingen zijn intraveneuze toediening voor systemische toepassingen, aërosolen voor de longen of door intravasculaire balloncatheters om endotheelcellen op specifieke lokaties te bereiken. DNA-eiwit complexen werken efficiënt *in vitro*, maar laten lage efficiënties en korte genexpressie zien in *in vivo* situaties. Non-virale vectoren hebben een aantal voordelen ten opzichte van virale vectoren: de afwezigheid van virale genen, een beperkte immuunrespons en ongelimiteerde transgengrootte. Daartegenover staan nadelen zoals de lage genoverdrachtefficiëntie en de tijdelijke duur van expressie van het transgen. Hierdoor worden non-virale methoden voornamelijk beperkt toegepast en dat met name wanneer relatief weinig genexpressie (cq. eiwit) nodig is. Gezien de belangrijke voordelen die non-virale vectoren bieden, wordt veel onderzoek gedaan om de genoemde beperkingen te overkomen.

1.4 Virale vectoren

1.4.1 RNA virussen

RNA virussen worden in toenemende mate ingezet als vectoren voor gebruik bij oncolytische virotherapie. Met uitzondering van retrovirussen coderen alle RNA virussen een RNA-afhankelijke RNA polymerase om de synthese van nieuwe genomen en mRNAs te katalyseren. De levenscyclus van RNA virussen bestaat uit de vorming van dubbelstrengs RNA, dat een spectrum van cellulaire defensiemechanismen activeert, waaronder de activering van proteïn kinase R (PKR) en het vrijkomen van interferon. Tumoren zijn vaak defectief in hun PKR signaaltransductie en interferon respons reacties en zorgen daardoor voor een relatieve permissief substraat voor de vermenigvuldiging van RNA virussen. Veel RNA virussen vertonen van nature enige tumorspecificiteit en kunnen worden ingezet als oncolyticum. RNA virussen die gebruikt worden voor experimentele oncolytische virotherapie zijn Newcastle diseasevirus, mazelenvirus, bofvirus, vesiculair stomatitis virus, influenzavirus, reovirus en poliovirus [Russell, 2000].

Retrovirussen

Retrovirussen en meer specifiek muizenoncoretrovirale vectoren worden veel toegepast bij genterapie, omdat ze stabiel kunnen integreren in het genoom en hierdoor kunnen zorgen voor een langdurige expressie. Voorwaarde voor integratie is dat cellen in deling zijn. Retrovirussen zijn RNA virussen voorzien van een envelop en veroorzaken uiteenlopende biologische effecten in hun gastheer variërend van goedaardige asymptomatische infecties tot ziekten als AIDS en kanker. Het virus bevat een lipide envelop en een nucleocapside (core), bestaande uit een eiwit capsid en het RNA genoom dat de genen voor *gag*, *pol*, en *env* bevat. De viruslevenscyclus kan verdeeld worden in twee stadia. Eerst bindt het virus aan een specifieke receptor en gaat de cel binnen. Vervolgens wordt het genomisch RNA overgeschreven in dubbelstrengs DNA, dat naar de kern wordt getransporteerd waar het integreert in het gastheergenoom. De integratie is willekeurig, zij het dat met name in actieve regio's van het genoom integratie plaatsvindt. Het geïntegreerde virusgenoom wordt provirus genoemd. Transcriptie van het provirus leidt tot productie van virusgenoom en van de viruseiwitten. Viruseiwitten en genomisch RNA kunnen vervolgens virusdeeltjes vormen en de cel via budding (afsnoering) verlaten. Van retrovirale vectoren voor genterapie worden de *gag*, *pol* en *env* genen verwijderd uit het virusgenoom en vervangen door het gewenste transgen. Zonder de virale genen kan het virus niet meer repliceren in normale gastheercellen.

Om het virus te produceren worden er helper- of ‘packaging’ cellen gebruikt. Deze zijn verder verbeterd om te voorkomen dat er replicatie-competente virussen zouden kunnen ontstaan door recombinatie van de vector met het plasmide met helperfuncties. Doordat de retrovirale vectoren geen eiwit-coderende virale genen meer bevatten, is de cellulaire immuunrespons tegen de vector beperkt.

Door de relatief willekeurige integratie van retroviraal provirus DNA bestaat het risico op insertiemutagenese. Bij apen met een onderdrukt immuunsysteem ontwikkelden zich lymfomen na infectie met replicatie-competente retrovirussen [Donahue RE, *et al.*, 1992]. De risico's door het gebruik van retrovirussen worden zoveel mogelijk beperkt door te zorgen dat er geen replicatie-competente retrovirussen gebruikt worden en de integratie van provirussen te beperken tot 1 kopie per cel. Insertiemutagenese wordt verder besproken in hoofdstuk 4.

Lentivirussen

Lentivirussen zijn complexe retrovirussen die naast de genen voor *gag*, *pol* en *env* coderen voor een set kleine geassocieerde eiwitten. Lentivirale vectoren hebben een belangrijk voordeel ten opzichte van de retrovirale vectoren afgeleid van de oncoretrovirussen.

Lentivirale vectoren kunnen ook in niet-delende cellen (zoals neuronen) integreren in het gastheer genoom.

Voor de productie van lentivirale vectoren wordt gebruik gemaakt van producercellijnen. In veel gevallen wordt gebruik gemaakt pseudotypering. Dit verandert het natieve tropisme van lentivirale vectoren, waardoor het mogelijk is om een breed spectrum van gastheerceltypen te kunnen infecteren. Vooralsnog worden bij al deze strategieën de genen die coderen voor deze envelopeiwitten niet in de vector opgenomen. Voor het *env* gen wordt het G-glycoproteïne van vesicular stomatitis virus (VSV-G) gebruikt. Daarnaast worden envelop glycoproteïnen van een groot aantal andere virussen gebruikt voor pseudotypering, onder andere het Marburg virus, het Ross-River virus en het baculovirus.

Er zijn diverse strategieën om de kans op recombinatie te minimaliseren en er geen ongecontroleerde virusreplacatie optreedt door te voorkomen dat er replicatie-competente virussen ontstaan. Naast het elimineren van homologe sequenties zijn zelf-inactiverende (self-inactivating, SIN) vectoren ontworpen. Deze vectoren hebben deleties van de ‘transcriptie enhancer’ in de 3' LTR, waardoor SIN lentivirale vectoren wel kunnen integreren, maar de productie van genomische transcripten is beperkt. Hierdoor wordt voorkomen dat het virus wordt gemobiliseerd door replicatie-competente lentivirussen. Vooralsnog zijn deze vectoren moeilijk op grote schaal te produceren, maar het ligt in de verwachting dat productie op

klinisch relevante schaal weldra tot de mogelijkheden gaat behoren. Naast de van HIV-1 afgeleide vectoren voor gentherapie zijn er lentivirale vectoren ontwikkeld die zijn van afgeleid van katten, paarden en apen lentivirussen [Connolly, 2002]. De ontwikkeling van het paardenvirus (equine infective anaemia virus, EIAV) is in een ver stadium. Het virus blijkt heel efficiënt te werken en zou bijvoorbeeld gebruikt kunnen worden ter behandeling van ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis). Dit paardenvirus is niet pathogeen voor de mens. Binnen een jaar worden de eerste klinische studies verwacht (<http://www.oxfordbiomedica.co.uk/index.htm>).

1.4.2 DNA virussen

Adenovirussen

De biologie van adenovirussen is goed bekend. Adenovirussen kunnen cellen efficiënt infecteren en het virus DNA in de gastheercel inbrengen. Zowel delende als niet delende cellen kunnen efficiënt worden geïnfecteerd. Het virus kan relatief gemakkelijk in grote hoeveelheden geproduceerd worden. In tegenstelling tot retrovirussen integreren adenovirussen in principe niet in het gastheergenoom.

Van de humane adenovirussen zijn meer dan 50 serotypen ontdekt. Het virion bestaat uit een dubbelstrengs lineair DNA genoom van ongeveer 36 kb, ingekapseld in een eiwitmantel. Het genoom bestaat uit vroege ('early') genen (E1, E2, E3 en E4), vertraagd vroege ('delayed early') genen (IX, IVa2) en late genen (L1-L5) met elk aparte functies in de virale levenscyclus. Adenovirussen binden aan cellen door hun fibereiwitten. Na absorptie wordt het virus opgenomen in het endosoom waar het dissocieert en ten dele zijn mantel verliest. Hierbij wordt het endosoom opgebroken waarbij het virus in het cytoplasma terechtkomt. Viraal DNA wordt naar de kern getransporteerd waar de transcriptie van RNA plaatsvindt. Vervolgens wordt het viraal mRNA getransleerd in het cytoplasma waarbij de viruseiwitten worden geproduceerd. De assemblage van het virus vindt in de kern plaats. De nieuw gemaakte adenovirussen komen tenslotte vrij via cellysis.

Alle huidige recombinante adenovirale vectoren hebben een deletie in E1, zodat de vector niet kan repliceren en er ruimte is voor het gewenste transgen. Verder ontbreken bij sommige recombinante adenovirussen E3 sequenties zodat er meer ruimte is voor het inbrengen van heteroloog transgen DNA. E3 producten zijn niet nodig voor virusrePLICATIE in gekweekte cellen, maar spelen wel een belangrijke rol *in vivo*, omdat ze geïnfecteerde cellen tegen opruiming door het immuunsysteem beschermen. Voor de productie van dergelijke defectieve adenovirussen wordt gebruik gemaakt van helpercellijnen. De 293 cellijn was de eerste

helpercellijn en nieuwere cellijnen 911 en PER.C6 zijn verbeterde versies, om het ontstaan van replicatie-competente recombinante virussen te voorkomen. Een beperking van het gebruik van recombinante adenovirussen is de immuniteit die er bestaat tegen adenovirussen in de bevolking. Een andere beperking is dat herhaalde toediening van adenovirus kan leiden tot snelle inductie van nieuwe immuniteit (zowel door antilichamen als door het cellulaire immuunsysteem), waardoor adenovirale vectoren geïnactiveerd worden, of getransduceerde cellen worden opgeruimd. Van dit effect wordt gebruik gemaakt door recombinant adenovirale vectoren in te zetten als kankervaccin. Dit wordt in hoofdstuk 2 verder besproken. Adenovirussen hebben de laatste jaren extra aandacht gekregen in verband met vector-geïnduceerde toxiciteit [St George, 2003]. Er worden verschillende benaderingen gevolgd om dit neveneffect te beperken, zoals het ‘targetten’ van adenovirussen. In hoofdstuk 3 wordt beschreven hoe de therapeutische index verbeterd kan worden.

Adeno-geassocieerde virussen

Adeno-geassocieerde virussen (AAV) zijn kleine, niet-pathogene, enkelstrengs DNA virussen die stabiel kunnen integreren in het genoom van zowel delende als niet-delende cellen. Met de van AAV afgeleide vectoren kan een langdurige genexpressie worden bereikt. In menselijke cellen is er een voorkeursregio waar wild type AAV integreert, namelijk in een specifiek locus op chromosoom 19. De meeste AAV vectoren zijn gebaseerd op het AAV-2 serotype. Van de populatie is 50-96% seropositief voor AAV-2. Verder zijn er nog ten minste 5 andere AAV serotypen gekarakteriseerd in primaten. Verschillende AAV serotypen vertonen verschillende weefsel- of celtropisme.

Herpesvirussen

Herpesvirussen waren de eerste gemodificeerde virussen die gebruikt werden voor virotherapie (virustherapie voor kanker). Herpes simplex virus vectoren zijn aantrekkelijk om dat ze veel celtypen en soorten kunnen infecteren, zijn cytolytisch (de replicatieve levenscyclus van het virus leidt tot gastheerceldestructie) en het goed gekarakteriseerde genoom biedt veel ruimte voor insertie van transgenen (tot 30 kb). Daarnaast zijn er diverse antiherpes middelen beschikbaar, waarmee eventuele ongewenste replicatie van het virus kan worden bestreden. Het virus integreert niet in het gastheer genoom en blijft als episoom in de geïnfecteerde cel aanwezig [Varghese & Rabkin, 2002].

Pokkenvirussen

Vaccinia is een dubbelstrengs DNA virus en maakt deel uit van de pokkenvirusfamilie. Het virus is in het verleden gebruikt bij het maken van het pokkenvaccin en het uitroeien van pokken. Vaccinia wordt nu gebruikt bij op kankergerichte strategieën. Vacciniavirus heeft een hoge infectie efficiëntie, repliceert in het cytoplasma en het 200 kb genoom maakt het mogelijk om grote stukken recombinant DNA in te voegen zonder dat dit ten koste gaat van de infectiviteit. Voor het ontwikkelen van kankervaccins worden de immunostimulatoire eigenschappen van het virus benut om zo een immuunrespons tegen kankercellen op te wekken. Verder worden conditioneel replicerende virale mutanten gemaakt om specifieke kankercellen te targeten.

Een ander lid van de pokkenfamilie is het kanariepokkenvirus. In termen van veiligheid en efficiëntie is het kanariepokkenvirus aantrekkelijk, omdat na infectie van humane cellen het virus een abortieve replicatie ondergaat, terwijl het transgen goed tot expressie komt.

2 Klinische studies

2.1 Inleiding

In 1989 is de eerste gentransferstudie bij patiënten uitgevoerd door Rosenberg en medewerkers [Rosenberg *et al.*, 1990]. Tumor infiltrerende lymfocyten werden getransduceerd met een retrovirus dat een neomycinegen als een zogenoemde marker bevatte. Vervolgens werden deze aan patiënten met gevorderde melanoma toegediend. Dit betrof een markerstudie, waarbij getransplanteerde cellen *in vivo* gevolgd kunnen worden. De eerste ‘echte’ genterapiestudie volgde vrij snel. In 1990 kregen twee ADA-SCID (Adenosine DeAminase-deficiënte Severe Combined Immunodeficiency Disease) patiënten autologe lymfocyten toegediend die getransduceerd waren met een retrovirale vector voorzien van het ADA-gen [Blaese *et al.*, 1995]. Na deze start van genterapie is het aantal klinische studies

Tabel 2. Relatieve verschuiving in ziekte-indicaties van klinische genterapiestudies tussen 1995 en 2004.

Ziekte-indicatie	1995 ⁽¹⁾	2001 ⁽²⁾	2004 ⁽³⁾
Kanker	49,1% (n=51)*	62,2% (n=331)	66,0% (n=608)
Monogene ziekten	18,9% (n=20)	13,3% (n=71)	9,8% (n=90)
Vaatziekten		6,8% (n=36)	8,3% (n=76)
Infectieziekten	7,5% (n=8)	6,8% (n=36)	6,5% (n=60)
Overige ziekten		1,9% (n=10)	2,6% (n=24)
Markerstudies	23,6% (n=25)	9,0% (n=48)	5,8% (n=53)
Gezonde vrijwilligers			0,8% (n=7)

⁽¹⁾ Orkin & Motulsky (1995)

⁽²⁾ Schalk *et al.* (2001) / J Gene Med (2001) www.wiley.co.uk/genmed/clinical

⁽³⁾ J Gene Med (2004) www.wiley.co.uk/genmed/clinical

* Getallen zijn percentages van het totale aantal studies (cumulatief), tussen haakjes zijn absolute aantal studies vermeld. Referentie 1 zijn data van studies afkomstig uit alleen de VS, referenties 2 en 3 zijn data afkomstig van de Wiley site en betreffen studies wereldwijd. Data uit 2004 bestaan voor 67% uit studies uit de VS.

flink toegenomen en zijn de toepassingen uitgebreid met onder andere vasculaire ziekten (*Tabel 2*). Circa tweederde van de tot nu toe wereldwijd uitgevoerde gentherapiestudies betreffen kankerpatiënten. In de loop van de tijd is het relatieve aandeel monogene ziekten ten opzichte van het totale aantal studies afgenomen. Dit is opmerkelijk gezien het uitgangsprincipe van gentherapie om (recessieve) erfelijke ziekten te voorzien van een therapeutisch gen en de verwachte succesansen. Verklaringen hiervoor zijn de grote verschillen in patiëntenaantallen en risicoafweging voor uiteenlopende patiëntengroepen. Er zijn veel meer patiënten met kanker dan met monogene aandoeningen en er zal een andere risicoafweging gemaakt worden bij de beschikbaarheid van alternatieve therapie mogelijkheden en/of levensverwachtingen. *Tabel 3* laat de relatieve verschuiving zien in gebruik van

Tabel 3. Relatieve verschuiving in gebruik vectoren bij klinische gentherapiestudies tussen 1995 en 2004.

Vectoren	1995 ⁽¹⁾	2004 ⁽²⁾
Retrovirussen	71,7 (n=76)*	28,0 (n=254)
Adenovirussen	14,2 (n=15)	26,0 (n=240)
Naakt/ Plasmid DNA	1,9 (n=2)	14,0 (n=132)
Lipofectie	11,3 (n=12)	9,3 (n=85)
Pokkenvirussen		5,7 (n=52)
Vacciniavirussen		3,3 (n=30)
Herpes simplexvirussen		2,8 (n=26)
Adenogeassocieerde virussen	0,9 (n=1)	2,1 (n=19)
RNA virussen		1,1 (n=10)
Overige vectoren		3,0 (n=23)
N/C		5,1 (n=47)

⁽¹⁾ Orkin & Motulsky (1995)

⁽²⁾ J Gene Med (2004) www.wiley.co.uk/genmed/clinical

* Getallen zijn percentages van het totale aantal studies (cumulatief), tussen haakjes zijn het absolute aantal studies vermeld.

N/C not communicated

verschillende vectoren bij klinische genterapiestudies tussen 1995 en 2004. Naast uitbreiding van typen vectoren valt op dat het gebruik van retrovirale vectoren is gedaald van ruim 70% naar minder dan 30%, terwijl gebruik van naakt DNA is gestegen van 2% naar 14%. De relatieve afname van retrovirale vectoren kan verklaard worden door de relatieve verschuivingen in ziekte-indicaties. Retrovirale vectoren worden veelal toegepast bij monogene ziekten en markerstudies en die laten een relatieve daling zien van 42,5% naar 14,6%. Gebruik van naakt DNA heeft voordelen op gebied van veiligheid, daarom wordt er gewerkt aan het verbeteren van de nadelen als lage efficiëntie en expressie.

2.2 Resultaten tot nu toe

Bij het beoordelen van de resultaten uit klinische genterapiestudies is het goed om te realiseren dat het merendeel fase I studies betreft. Deze studies zijn in eerste instantie bedoeld om de veiligheid vast te stellen en zijn nog niet bedoeld om effectiviteit te laten zien (zie ook *Tabel 4* met toelichting ‘Fasering in klinische studies’). In de eerste tien jaar van klinische genterapiestudies zijn bij behandelde patiënten geen ernstige bijwerkingen gemeld.

Dit veranderde in september 1999. In een klinische fase I studie, waarin het ornithine transcarbamylase gen (OTC, een leverenzym) met behulp van een adenovirale vector werd toegediend, waren al 17 patiënten behandeld in het ziekenhuis van de universiteit van Pennsylvania. De volgende patiënt, de 18-jarige Jesse Gelsinger, kreeg $3,8 \times 10^{13}$ virale deeltjes toegediend (omgerekend waren dit 3×10^9 eenheden van *infectieuze* virale deeltjes/kg) via een catheter in één van de vertakkingen van de leverslagader. Dit leidde tot een heftige immuunreactie en tot een ongecontroleerde ontstekingsreactie die talloze organen aantastte en na 4 dagen de dood veroorzaakte [Dumon *et al.*, 2000].

Specifieke analyse van de vectorbatch die aan deze patiënt werd toegediend, toonde geen bijzonderheden. Dit incident heeft geleid tot het opnieuw kritisch doornemen van klinische genterapieprotocollen en strenger evalueren van klinische data.

Na deze tegenslag konden in het jaar daarop verschillende positieve resultaten worden gemeld. In 2000 is de eerste genezing van X-linked SCID patiënten gerapporteerd [Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000].

Verder zijn er positieve resultaten gevonden in een fase I studie bij hemofiliepatiënten. Als eerste deelnemers in een dosis escalatiestudie ontvingen drie patiënten de laagste dosis van de vector (2×10^{11} AAV vectorgenomen per kg lichaamsgewicht).

Tabel 4. Fasering van klinische studies.

Fase I: beoordeling toxiciteit

Eerste studies bij mensen voor het verzamelen van data over dosering, timing en veiligheid – maar niet effectiviteit – van een onderzoeksbehandeling bij een klein aantal proefpersonen. De studies betreffen doorgaans een dosisesescalatie om de maximaal tolereerbare dosis te bepalen. Verder worden data van het therapeuticum over absorptie, metabolisatie en verdeling over het lichaam verzameld.

Fase II: beoordeling effectiviteit

Verdere evaluatie van de veiligheid van de behandeling alsook de effectiviteit volgens vooraf vastgestelde parameters.

Fase III: beoordeling experimentele behandeling beter dan standaardbehandeling

Op grotere schaal verkrijgen van effectiviteitsdata van grote aantallen patiënten om te bepalen of de bestudeerde behandeling beter is dan de huidige standaardbehandeling en vergelijking van de bijwerkingen.

Op basis van preklinische data uit diermodellen, was de verwachting dat deze dosis geen verhoging van de circulerende factor IX concentraties zou veroorzaken. Bij twee patiënten werd echter een klinische respons gevonden waarbij een 50 tot 80% afname in het gebruik van factor IX concentraten door kleine verhogingen in circulerend factor IX werd gevonden. De derde patiënt met het minst ernstige fenotype liet geen meetbare effecten zien na vectortoediening [Kay *et al.*, 2000, Manno *et al.*, 2003].

In een dosisesescalatiestudie bij 29 patiënten met kritische beenischemie werden significante klinische verbeteringen gezien na intramusculaire injectie van naakt DNA met de humane vasculaire endotheelgroefactor (VEGF) onder controle van CMV promoter [Simovic *et al.*, 2001]. Ook toepassing van VEGF door middel van adenovirale vectoren liet positieve resultaten zien [Simons & Ware, 2003, Makinen *et al.*, 2002].

Een tweede incident in het gentherapieveld volgde in 2001/2002 met de melding van het ontstaan van leukemie bij twee patiënten in een studie met retrovirale vectoren ter behandeling van X-gebonden SCID [Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2002]. Het feit dat het relatief lang heeft geduurd voordat de leukemie ontstond (2,5 jaar na gentherapie en retrospectief gezien 1 jaar na detectie van een specifieke T-celkloon) wijst er op dat meerdere factoren noodzakelijk zijn. In hoofdstuk 4 worden verschillende risicofactoren nader besproken.

2.3 Virotherapie

Aangezien tegenwoordig tweederde van de klinische studies kankerpatiënten betreft, wordt hier nog iets dieper ingegaan op virotherapie (virustherapie voor kanker). Het idee om virussen te gebruiken om kanker te bestrijden is niet nieuw. In de vorige eeuw werden honderden kankerpatiënten behandeld met wild-type virussen, waarbij gebruik gemaakt werd van de natuurlijke eigenschappen van selectieve virusreplicatie in tumorcellen. Echter vanwege het optreden van toxiciteit werd hiermee gestopt [Southam, 1960]. Met de komst van recombinant-DNA technologie konden virussen veiliger gemaakt worden. Hierbij is in eerste instantie gekozen om de virale vectoren replicatie-incompetent te maken en te voorzien van een therapeutisch gen. Hiervoor worden diverse tumorsuppressorgenen (zoals p53) gebruikt of cytokinen (zoals IL-2, IL-12, TNF).

Na het aanvankelijk bemoedigende resultaat van de eerste klinische studie van p53 gentransfer bij non-small-cell lung carcinoma in 1996 zijn de hierop volgende resultaten enigszins teleurstellend. Inmiddels zijn er zeker 20 andere studies uitgevoerd waarbij gebruik gemaakt wordt van herstellen van p53 functie, al dan niet in combinatie met chemotherapie. Ondanks de beperkte klinische effectiviteit is wel duidelijk geworden dat genterapiebehandeling over het algemeen goed getolereerd wordt met minimale toxiciteit. Alleen een fase III studie van ovariumkanker behandelt met p53 adenovirusgenterapie is stopgezet wegens uitblijven van effect en optreden van toename in toxiciteit [Zeimet & Marth, 2003].

Om de klinische effectiviteit van kankergenterapie te verhogen zouden de eigenschappen van virussen om (selectief) in kankercellen te kunnen repliceren meer uitgebuit moeten worden. Een aantal jaar geleden is virotherapie dan ook weer nieuw leven ingeblazen. Virussen met inherente tumor-selectiviteit zijn bijvoorbeeld reovirus, vesicular stomatitis virus, New Castle disease virus (NDV) en autonome parvovirussen. Natuurlijk voorkomende infecties met deze virussen zijn ofwel asymptomatisch (bijvoorbeeld reovirus) of veroorzaken milde ziektesymptomen (bijvoorbeeld NDV). De eerste toepassing van recombinante virussen met een gendeletie was met herpes simplex virus-1 (HSV-1). Thymidine kinase deletiemutanten replicateerden inefficiënt in normale cellen, maar replicateerden efficiënt in maligne gliomacellen, verspreidden zich naar andere cellen en lieten een dosis-afhankelijke toename van overleving zien in dieren met hersentumoren [Martuza *et al.*, 1991]. Een verbeterde versie hiervan, G207, was de eerste HSV vector die werd toegepast in klinische

studies. Er werd geen shedding of toxiciteit waargenomen. Een fase II studie is nodig om de effectiviteit van deze toepassing te kunnen vaststellen.

Verder zijn adenovirale vectoren aangepast om selectief in tumoren te repliceren. Het adenovirus E1B 55 kDa eiwit onderdrukt p53 functie in geïnfecteerde cellen en E1B 55K gedeleteerde adenovirale vectoren zijn mogelijk in staat om te repliceren in tumorcellen en cytolyse te veroorzaken wanneer p53 functie defect is. In de laatste paar jaar zijn 6 verschillende fase I/II studies uitgevoerd met dergelijke virussen (bekend als dl1520, ONYX-015 en CI-1042) voor verschillende tumortypen. VirusrePLICATIE varieerde afhankelijk van het tumortype en/of de toedieningswijze. VirusrePLICATIE trad op in hoofd / hals- en dikke darmtumoren na intratumorale of intra-arteriële toediening. Een klinische respons werd alleen gezien wanneer gentransfer werd gecombineerd met chemotherapie [Khuri *et al.*, 2000]. Tot slot kan vaccinatie tegen tumor geassocieerde antigenen genoemd worden. Tijdens het ontwikkelen van kanker worden abnormale of een overmaat aan eiwitten geproduceerd die immunogeen zijn. Echter de immuungecompromitteerde conditie van een kankerpatiënt of het ontwijken van het immuunsysteem door tumorcellen kan voorkomen dat een goede immuunrespons optreedt. Vaccinatie tegen deze eiwitten kan mogelijk het immuunsysteem activeren om de tumorcellen aan te vallen. Een veel gebruikt virus als kankervaccin is het vacciniavirus. In fase I studies worden nog geen systemische antitumor responsen gezien ofschoon tumorinfiltratie door CD4+ en CD8+ lymfocyten gemeld is. Verschillende RNA virussen worden nu in klinische studies geëvalueerd. Tegenvallende resultaten bij het gebruik van het vacciniavirus kunnen mogelijk verklaard worden doordat veel kankerpatiënten in hun jeugd een poliovaccinatie hebben gekregen, waardoor recombinant vaccinia virus herkend en geïnactiveerd wordt.

Voor het uitblijven van een echt succes bij overige klinische kankergentherapiestudies tot nu toe kunnen een aantal oorzaken genoemd worden. Ten eerste is er het probleem van het efficiënt transduceren van de doelcellen. Zeker voor toepassing bij kanker is het van belang dat alle tumorcellen bereikt worden. Hoe kun je vectoren in (uitgezaaide) tumoren op de gewenste plaatsen krijgen? Hier is nog veel ruimte voor verbetering. Ten tweede is er goede kennis van tumorbiologie noodzakelijk. Bij gebruikmaking van tumorsuppressorgenen bestaat de mogelijkheid dat bijvoorbeeld p53 gewoon het 'verkeerde' transgen is. Ofschoon p53 mutaties gevonden zijn in veel tumoren en defectieve p53 functie gekoppeld is aan chemotherapieresistentie, blijven er veel aspecten van p53 biologie onduidelijk. Met het toenemen van kennis over de werkingsmechanismen van kanker zal ook gentherapie beter ingezet kunnen worden.

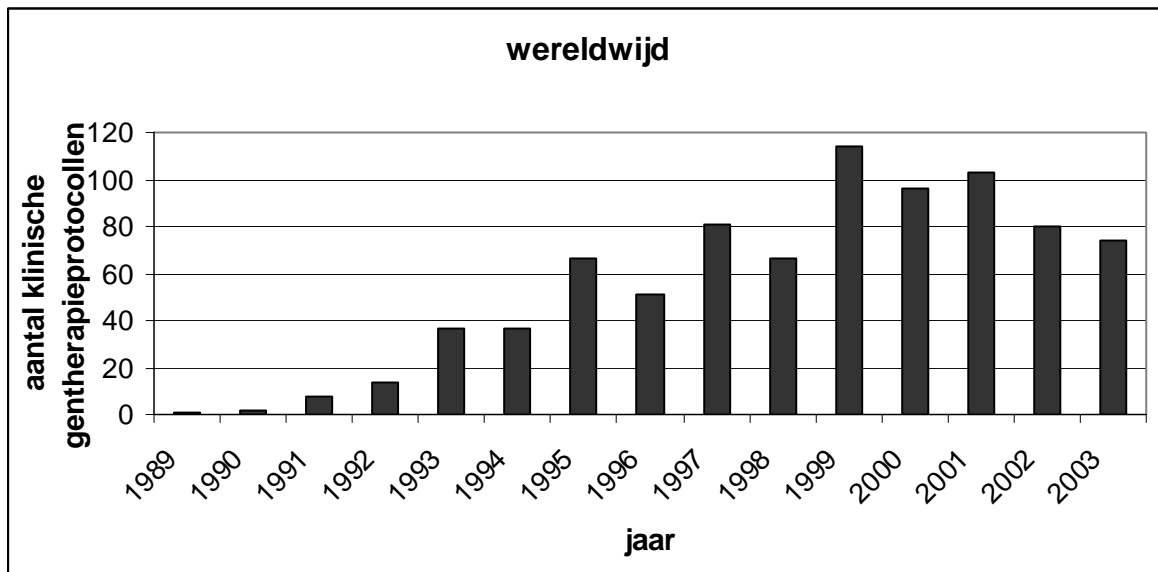
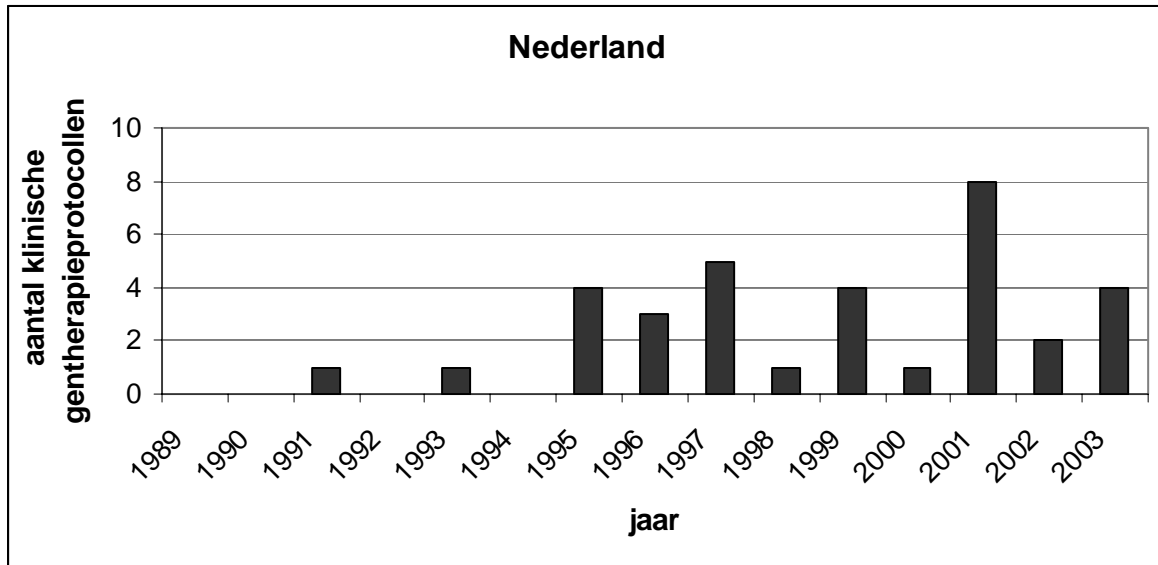
Voor uitgebreidere toelichting wordt verwezen naar enkele overzichtsartikelen [Kirm *et al.*, 2001, Nemunaitis & Edelman, 2002, Reid *et al.* 2002, Vile *et al.*, 2002].

2.4 Klinische studies Nederland

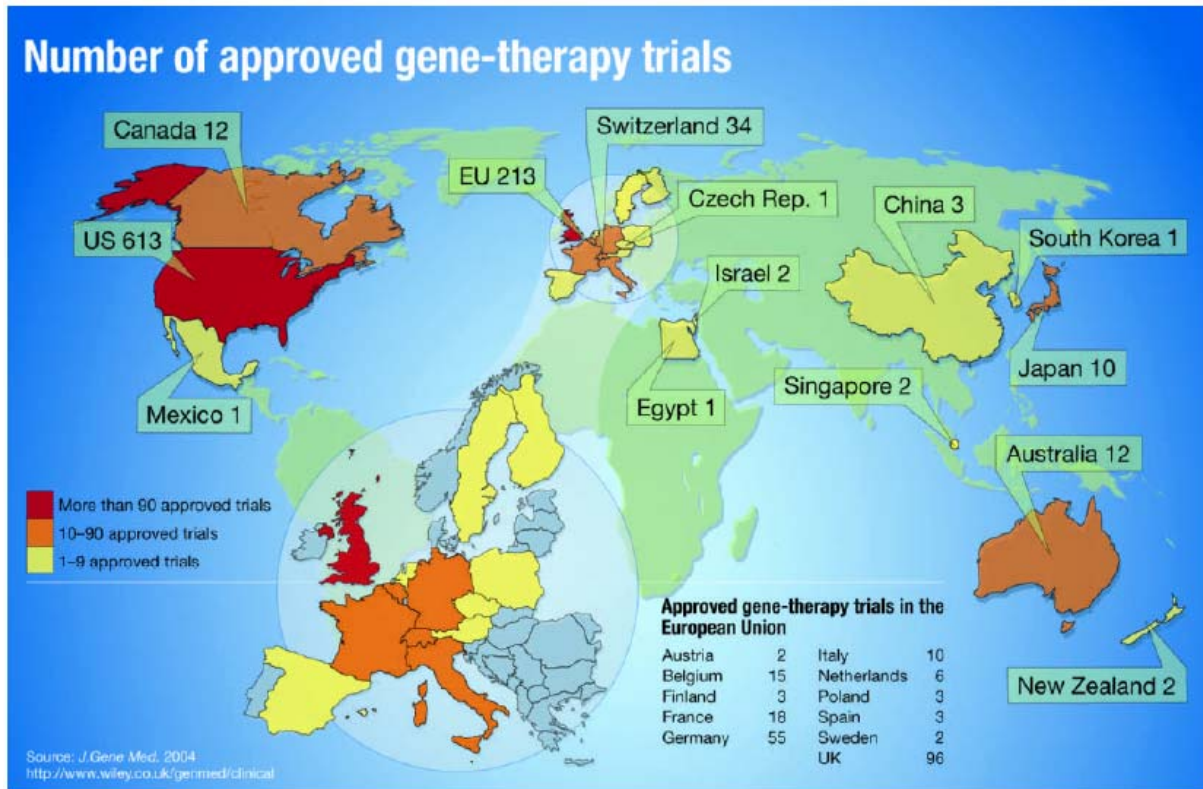
In Nederland werd in 1991 het eerste klinische genterapieprotocol aangevraagd en gehonoreerd. Medio 2004 zijn inmiddels 34 aanvragen 'Introductie in het Milieu' ingediend (zie *Figuur 1* voor aantal aanvragen per jaar). Van deze 34 protocollen zijn er 13 teruggetrokken op verzoek van de aanvrager. Van 2 studies ligt de ontwerpbeschikking ter inzage en kunnen er bezwaren worden ingediend. De overige 19 zijn van kracht. Dit betekent dat de beschikking is afgegeven en dat de vergunning gebruikt mag worden tot de benoemde einddatum. Meer details van de individuele studies zijn weergegeven in de bijlage. Van de lopende studies zijn de meeste gericht op de behandeling van kanker, twee bedoeld om doorbloedingsstoornissen te verbeteren, een ter behandeling van de ziekte van Crohn, een voor vaccinatie tegen HIV en recent is een studie gestart ten behoeve van het vastzetten van heupprothesen. Deze klinische studies maken gebruik van uiteenlopende vectoren, gebaseerd op adenovirus, adeno- geassocieerd virus, retrovirus, Semliki Forest virus, Modified Vaccinia Ankara, DNA plasmide en recombinante bacteriën.

Een actueel overzicht van de afgegeven vergunningen ten behoeve van klinische genterapie studies en verdere details (zoals de tekst van de beschikking) zijn te vinden op de website van VROM en door te klikken naar gezondheid & veiligheid \ biotechnologie \ vergunningendatabase \ introductie in het milieu veldproeven en genterapie \ en vervolgens als zoekterm 'genterapie' te gebruiken. Aangezien deze gegevens alleen in het Nederlands vermeld staan zijn deze slecht toegankelijk voor buitenlandse belangstellenden. Dit verklaart mogelijk waarom Nederland doorgaans ontbreekt (of slechts 6 studies vermeld worden) in veel overzichten van klinische genterapiestudies wereldwijd (zie *Figuur 2*). Nederland staat hierin overigens niet alleen. Van Noorwegen worden geen klinische genterapiestudies gemeld, terwijl dit er voor 2004 reeds 7 waren [Myklebost, 2004]. Het Verenigd Koninkrijk en België staan daarentegen beter vermeld met respectievelijk 96 en 15 studies, waarvan de gegevens eenvoudiger toegankelijk zijn [UK Department of Health: Gene Therapy Advisory Committee, <http://www.advisorybodies.doh.gov.uk/genetics/gtac/index.htm>, the Belgian Biosafety Server, http://www.biosafety.be/GT/Regulatory/Table_1.html].

Figuur 1. Aantal afgegeven vergunningen ten behoeve van klinische getherapieprotocollen per jaar in Nederland en wereldwijd. Cumulatieve aantallen eind 2003 zijn voor Nederland 34 en wereldwijd 830 protocollen. Bronnen data: www.vrom.nl en J Gene Med 2004, <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>.



Figuur 2. Aantal goedgekeurde klinische genterapiestudies wereldwijd [illustratie overgenomen van Cavazzana-Calvo *et al.*, 2004, bron data: J Gene Med 2004, <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>].



2.5 Regulatorie kwesties

In Nederland worden klinische genterapieprotocollen door verschillende instanties beoordeeld (zie *Figuur 3*). Dit zijn de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO), het Ministerie van VROM (waarbij de uitvoerende instantie bureau GGO is en als adviserende instantie de COGEM optreedt) en de Inspectie voor de Gezondheidszorg (IGZ) die zich hierbij laat adviseren door het RIVM. Er zijn besprekingen om de indiening bij de verschillende instanties te stroomlijnen.

Naar aanleiding van het optreden van leukemie bij twee X-SCID patiënten na genterapie zijn er uiteenlopende maatregelen in verschillende landen getroffen. In het Verenigd Koninkrijk zijn klinische studies bijvoorbeeld nooit stopgezet, terwijl in Italië behandeling in 2003 alleen op individuele basis werd goedgekeurd als er sprake was van een levensbedreigende situatie. Een overzicht van maatregelen staat in de bijlage vermeld. Op Europees niveau is er geen

3 Nieuwe ontwikkelingen

Het onderzoek dat er op dit moment in de laboratoria wordt gedaan geeft een goed beeld over de in de komende jaren te verwachten klinische genterapiestudies. Dit biedt de mogelijkheid om te anticiperen op deze ontwikkelingen en de mogelijk benodigde veiligheidsmaatregelen te bepalen. Desalniettemin zal men, net zoals bij ieder andere nieuwe therapie, moeten accepteren dat niet alles vanuit preklinische studies in een klinische setting te voorzien zal zijn.

Hieronder wordt een aantal toekomstverwachtingen beschreven. Deze zijn gebaseerd op de meer algemene trends in vectortechnologieën, gevolgd door gesignaleerde actuele ontwikkelingen bij verschillende ziektebeelden. Tot slot is er naast de mondiale trends aandacht voor meer specifiek Nederlandse ontwikkelingen.

3.1 Trends onderzoeksontwikkelingen

In het algemeen kan gesteld worden dat de ontwikkelingen zullen gaan in de richting waar nu de beperkingen of problemen optreden. Dit betreffen (1) het optimaliseren van specifieke targetting van vectoren. Dit kan door beperken van transductie van specifieke celtypen en/of door gebruik te maken van celspecifieke promotoren. (2) Verhogen transductie-efficiëntie door gebruik te maken van selectief replicerende vectoren, met name voor toepassing bij kankertherapie. (3) Reductie van immunogeniteit door uiteenlopende aanpassingen van vectoren en (4) preventie van insertiemutagenese door verbeteren van of wijzigen keuze vectoren. Daarnaast zal, nu het basisconcept van genterapie bewezen is, de aandacht steeds meer gericht worden op het optimaliseren van de wijze van toediening en formulering. Deze ontwikkelingen zullen ook meer ondersteund worden door nieuw ontwikkelde diermodellen die een betere weerspiegeling vormen van wat er in de humane situatie gebeurt.

Na dit algemeen geschetste beeld wordt hieronder eerst kort ingegaan op non-virale toepassingen, waaronder RNA-interferentie, een relatief nieuwe en belovende techniek die ook binnen het genterapieveld een interessante aanvulling kan zijn. Hierna wordt er ingegaan op virale vectortechnologie en vervolgens wordt er afgesloten met een stuk over systemische productie van therapeutische eiwitten.

3.2 Vectortechnologie

3.2.1 Non-virale vectoren

Het gebruik van naakt DNA zal door verbeteringen van de techniek in de toekomst mogelijk verder toenemen [Niidome & Huang, 2002, Herweijer & Wolff, 2003]. Een veel genoemd voordeel van non-virale gentransfer is de minder sterke immunrespons die wordt opgewekt in vergelijking met virale vectoren. Op het terrein van de genoverdrachthefficiëntie worden grote verbeteringen gemaakt. Dit gebeurt bijvoorbeeld door het toedieningsprotocol of de samenstelling van het DNA aan te passen. Een andere strategie om langdurige genexpressie te kunnen bereiken is door het inbouwen van twee genetische elementen van Epstein-Barr virus, het EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) gen en het oriP element in de plasmid vector. Hierdoor kan het plasmide zich episomaal handhaven. Daarnaast wordt getracht om gecontroleerde integratie van plasmid DNA in het gastheergenoom te bewerkstelligen door gebruik te maken van een oud transposon ('Sleeping Beauty') en verschillende bacteriofaagintegrasen. Vooralsnog is integratie nog geen efficiënt proces [Niidome & Huang, 2002]. Klinische studies waarbij nonvirale gentransfer wordt toegepast zijn onder andere gericht op gentherapie bij Duchenne spierdystrofie, ischemie en hemofilie [Herweijer & Wolff, 2003].

RNA interferentie

Gentherapie is voornamelijk gericht op het introduceren van therapeutische genen, maar zou ook ingezet kunnen worden om genen uit te schakelen. In een paar jaar tijd is dubbelstrengs RNA-gemedieerde interferentie (RNAi) opgekomen als veelbelovende techniek om op een relatief eenvoudige manier genexpressie te remmen of uit te schakelen. RNAi wordt getriggered door kleine segmenten van dubbelstrengs RNA (siRNAs) en leidt uiteindelijk tot afbraak van mRNAs die homologe sequenties hebben aan de siRNAs. RNAi wordt geïnduceerd door kleine segmenten van dubbelstrengs RNA ('short interfering' RNAs of siRNAs, van 21-25 bp lengte). Uiteindelijk worden mRNAs met een sequentie complementair aan het siRNA snel afgebroken. Zowel *in vitro* als *in vivo* is aangetoond dat RNAi efficiënt de expressie van specifieke genen kan doen afnemen. Het is door de hoge sequentie specificiteit mogelijk om onderscheid te maken tussen wild-type en mutant transcripten [Kolfshoten & Agami, 2003]. De verwachting is dat eerdere problemen opgetreden bij genoverdracht, minder relevant zijn voor siRNA. siRNAs moleculen zijn veel kleiner dan de gebruikelijke plasmiden met genexpressie cassettes, waardoor ze efficiënter door cellen worden

opgenomen. Daarnaast hoeven siRNAs niet naar de kern te worden getransporteerd, aangezien ze hun werking in het cytoplasma hebben [Herweijer & Wolff, 2003]. In eerste instantie werd gebruik gemaakt van chemisch gesynthetiseerde kleine ‘small inhibitor’ RNAs (siRNAs). Meer recent worden plasmide en virale vectoren gebruikt voor expressie van short-hairpin RNAs, zowel *in vitro* als *in vivo*. Door EBNA1 gen en oriP element aan het plasmide toe te voegen (Epstein-Barrvirus-gebaseerde plasmiden) kon transfectie-efficiëntie, expresseduur en werkzaamheid verhoogd worden. Positieve resultaten zijn onder andere laten zien bij het remmen van HIV [Park *et al.*, 2003], hepatitis B [McCaffrey *et al.*, 2003] en verschillende vormen van kanker [Tuschl & Borkhardt, 2002]. In 1998 is door ISIS Vitravene® (fomivirsen sodium, een oligonucleotide van 21 nucleotiden) geregistreerd. Dit wordt gebruikt in oogdruppels ter behandeling van cytomegalovirus retinitis (CMV-R) bij AIDS patiënten. Het bindt aan homologe sequenties in een CMV mRNA waardoor de replicatie van het virus wordt geremd. Dit is ook wel genoemd als het eerste geregistreerde genterapieproduct [Haisma, 2004]. Dit is in feite een definitiekwestie. RNA interferentie kan op twee manieren toegepast worden, ofwel door siRNA moleculen toe te dienen, ofwel door een DNA construct te gebruiken dat vervolgens het gewenste RNA maakt. Vitravene® is het eerste antisense product dat door de FDA is goedgekeurd. Duidelijk is wel dat chemisch gesynthetiseerde RNA producten veel eenvoudiger en goedkoper te produceren zijn dan virale vectoren. Een beperking is echter dat de hoeveelheid en tijd dat het product aanwezig is beperkt is, waardoor het gebruik van bepaalde virale vectoren in de praktijk effectiever kan zijn bij bepaalde toepassingen.

DNA vaccins

Een andere recente toepassing van non-virale vectoren zijn DNA vaccins. DNA vaccins worden niet alleen gebruikt om infectieziekten te voorkómen (malaria en HIV), maar kunnen ook worden ingezet bij de behandeling van kanker. Conventionele vaccins kunnen onderverdeeld worden in drie typen, namelijk levende verzwakte vaccins, gedode hele vaccins en gezuiverde component vaccins (subunit vaccins). Doordat geïnactiveerde complete celvaccins of subunit vaccins (vaak) niet voldoende bescherming bieden en levende verzwakte vaccins soms risico's met zich meebrengen, wordt nu gewerkt aan zogenoemde DNA vaccins. Een DNA vaccin is een polynucleotide dat codeert voor het gewenste immunogen. Dit immunogeen wordt in de cel aangemaakt na toediening aan de gastheer. Doordat het immuniserende materiaal in de gastheercel wordt geproduceerd ontstaat er mogelijk een meer natuurlijke presentie en worden B- en T-celresponsen opgewekt.

3.2.2 Virale vectoren

Modificatie tropisme van virale vectoren

Ofschoon al langer gewerkt wordt aan het specifiek richten van vectoren naar doelweefsel of cellen, zal dit type onderzoek verder uitgebreid worden. Hieronder wordt een aantal voorbeelden gegeven van adenovirale vectoren waarbij het tropisme wordt gewijzigd.

Vergelijkbare strategieën worden ook bij tal van andere virale vectoren gevolgd.

Het modificeren van het tropisme van virale vectoren, door deze te sturen naar andere dan de natuurlijke receptor heeft een aantal voordelen. In het ideale geval wordt de transductie beperkt tot de gewenste doelcellen, waardoor de grootste effectiviteit met de laagste dosis bereikt kan worden. Ook kan het de gevolgen van een bestaande tegen het virus gerichte neutraliserende antilichaam respons voorkomen of beperken [St. George, 2003].

Van de humane adenovirussen zijn meer dan 50 verschillende serotypen bekend. Hierdoor is het mogelijk om adenovirus vectoren te pseudotyperen door capsiden van andere serotypen te gebruiken, of om nieuwe adenovirale vectoren te ontwikkelen op basis van vectoren waartegen slechts een geringe immuniteit bestaat in de populatie. Ook worden vectoren afgeleid van niet-humane adenovirussen, bijvoorbeeld die van apen, runder, varkens, schapen of honden adenovirussen. Deze laatste benadering heeft nog als voordeel dat neutralisatie van de gebruikte vector door bestaande antilichamen (de zogenaamde ‘pre-existing immunity’) tegen het humane adenovirus in zeer grote mate omzeild kan worden.

Andere manieren om virussen gericht bepaalde cel- of weefseltypen te laten transduceren kunnen in twee groepen ingedeeld worden. De ene strategie is om het virale capside te modificeren door genetische veranderingen (bijvoorbeeld in de fiber DNA van het adenovirus) aan te brengen. Deze modificatie wordt zo gekozen dat een andere receptor kan worden gerecruteerd. De andere strategie is door het gebruikmaken van twee componenten die aan elkaar gekoppeld zijn. Hierbij bindt het ene deel aan de vector en het andere deel aan een specifieke receptor. Een veelgebruikte strategie is het gebruik van bi-specifieke antilichamen. Het voordeel van het twee componentensysteem is dat veel verschillende receptoren getarget kunnen worden, terwijl de vector zelf niet genetisch aangepast hoeft te worden. Onlangs is er ook een combinatie van de beide strategieën gepubliceerd [van Beusechem *et al.* 2003]. Hierbij wordt in het genoom van een virale vector een expressiecassette geplaatst die codeert voor een antilichaam met bovengenoemde eigenschappen.

Selectieve virusrepliatie

Voor de eerste toepassing van genterapie is veel energie gestoken in het defectief maken van virale vectoren, zodat er geen replicatie meer kon optreden in de patiënt. Virusrepliatie was alleen nog mogelijk in zogenaamde helpercellijnen. Toch kan virusrepliatie ook ten voordele worden gebruikt. In hoofdstuk 2 werd al vermeld dat er in het verleden juist gebruik gemaakt van tumorspecifieke replicatie van virussen, maar dat deze strategie werd gestaakt door het optreden van toxiciteit. Indien het mogelijk is om de toxiciteit te beperken en virusrepliatie te beperken tot de tumorcellen zou de effectiviteit van kankergenterapie kunnen verbeteren. Lokaal in de tumor zou de virale vectordosis kunnen toenemen, terwijl gezonde cellen niet aangetast zouden worden. Hieronder zijn een paar voorbeelden beschreven, maar de varianten hierop en mogelijke virustypen zijn zeer uitgebreid.

Er zijn verschillende strategieën mogelijk voor tumorspecifieke virusrepliatie. Ontwerpen van selectief replicerende virussen zijn gebaseerd op kennis van de virale levenscyclus en tumorbiologie. Het adenovirus E1B 55 kDa eiwit onderdrukt p53 functie in geïnfecteerde cellen. E1B 55 K gedeleteerde adenovirale vectoren kunnen repliceren in tumoren die een defectieve p53 functie hebben en zorgen voor cytolyse (bekende voorbeelden zijn de vector ONYX-015 of dl1510). De praktijk bleek weerbarstiger. Naast het E1B 55 K eiwit zijn ook andere adenovirale eiwitten betrokken bij p53 interacties, waardoor de behaalde specificiteit tegenviel. Daarom wordt gewerkt aan selectie van E1B 55kDa mutanten die niet meer binden aan p53 en geen andere belangrijke functies kwijtraken. Nieuwere deletievarianten kunnen effectiever en selectiever zijn om tumorcellen te lyseren.

Een ander voorbeeld zijn herpes simplexvirussen, waarbij deletie van virale gen RL1 zorgt voor het elimineren van ICP34.5 expressie. Dit is een eiwit dat betrokken is bij het reguleren van het 'proliferating cell nuclear antigen' (PCNA). PCNA is een eiwit dat noodzakelijk is voor cellulaire DNA replicatie en herstel. ICP34.5 is nodig om PCNA te laten switchen van DNA herstelactiviteiten naar DNA replicatie, wat een voorwaarde is voor de initiatie van herpes simplexvirusrepliatie. In gezonde cellen zorgt afwezigheid van ICP34.5 er voor dat herpes simplexvirus zich niet meer kan repliceren. Echter in veel kankercellen is PCNA verhoogd aanwezig en kan virusrepliatie plaatsvinden waardoor selectieve tumorcellulysis kan optreden.

Naast het gebruik van adenovirus en herpes simplexvirus, worden er diverse andere virussen ontwikkeld met een intrinsieke tumorselectiviteit (bijvoorbeeld reovirus, mazelenvirus, Newcastle Disease virus). Tumorspecifieke replicatie kan verder versterkt worden door combinatie met specifieke tumorceltargeting en het gebruik van tumorspecifieke promotoren.

Interacties met immuunsysteem

De immuunrespons tegen virale vectoren speelt een cruciale rol in de lange termijn expressie en klinische effectiviteit van de virale vectoren. Virale vectoren induceren de afgifte van cytokinen, interleukinen, activeren macrofagen, induceren T- en B-celresponsen, induceren virus-neutraliserende antilichamen en induceren activatie van het endothelium. Het onderdrukken van de immuunrespons (door bijvoorbeeld CTLA4-Ig, sCD40L) zal transgenexpressie in verschillende organen als lever, spier, long of hart verlengen. Nadeel is echter dat deze onderdrukking niet specifiek is en de patiënt evenmin meer in staat is om op andere infecties te reageren. Daarom is de aandacht nu verschoven naar het ontwijken van de immuunrespons door aanpassing van de virale vectoren. Dit is gedaan door de vectoren zoveel mogelijk te minimaliseren. In het humane adenovirus bleken er echter enkele genen in de E3 regio te coderen voor immuunregulatorische eiwitten die ervoor zorgen dat het virus kan ontsnappen aan het opruimen door het immuunsysteem, waardoor infectie kan persisteren en zijn derhalve weer teruggeplaatst in de virale vector [Schagen *et al.*, 2004]. Afhankelijk van de toepassing kunnen overigens ook functies van het virus zelf nuttig zijn. Bij de behandeling van tumoren zijn ook lytische eigenschappen gewenst om zo tumorantigenen vrij te maken uit tumorcellen, waardoor dendritische cellen en T-cellen de nodige signalen kunnen geven die nodig zijn om een immuunrespons in gang te kunnen zetten, waardoor ook het ontwikkelen van een systemische antitumor immuunrespons kan optreden. Verder worden allerlei immunostimulatorische genen in virale vectoren ingebracht om zo de lytische eigenschappen van het virus te koppelen aan de antitumor immuunrespons van de gastheer. Hierbij dient wel naar een evenwicht te worden gezocht, immers niet alleen de tumorcellen, maar ook het virus zelf wordt opgeruimd door het immuunsysteem [Hermiston, 2000, Nemunaitis & Edelman, 2002]. Een andere recente strategie om transgen gecodeerde antigenen onzichtbaar te maken voor het immuunsysteem is door gebruik te maken van zogenaamde ‘stealth’ eiwitten. Een voorbeeld is gebruikmaking van een remmer van proteasomale degradatie, afkomstig van het Epstein-Barrvirus [Ossevoort *et al.*, 2003]. Het Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen-1 (EBNA-1) komt tot expressie in latent EBV geïnfecteerde cellen en is nodig voor handhaving van virale episomen. EBNA-1 dat endogeen tot expressie wordt gebracht, wordt niet herkend door het immuunsysteem. Dit wordt toegeschreven aan de glycine-alanine repeat (GAR) domein in EBNA-1 sequentie dat EBNA-1 beschermt tegen proteasomale afbraak en vervolgens presentatie in de context van MHC klasse I.

Uit een recente publicatie is duidelijk geworden dat er grote verschillen bestaan tussen transgenexpressie en immuunrespons bij verschillende muizenstammen en de kans bestaat dat

dit ook opgaat voor andere soorten en relevant kan zijn voor klinische studies. In het onderzoek van Zhang en collega's [2004] was de antilichaamrespons bestudeerd in 12 verschillende muizenstammen die AAV-2 intramusculair hadden toegediend gekregen. Alle immuuncompetente muizen ontwikkelden een serologisch bewijs van immuunrespons tegen het virus. Er werd echter juist bij immuundeficiënte muizenstammen een nog niet eerder beschreven serologische 'prozone' effect gezien, wat inhoudt dat vals negatieve resultaten worden gevonden ten gevolge van zeer hoge antilichaamtiters. Dit suggereert dat de concentraties anti-AAV-2 antilichamen in het verleden onderschat zijn. Bovendien bleken stammen met genetische predispositie voor auto-immuniteit antilichaam reacties te vertonen tegen AAV gemedieerde transgenproductie (green fluorescent protein, GFP), terwijl de stammen zonder afwijking in het immuunsysteem geen antilichamen tegen GFP ontwikkelden. Dit betekent dat patiënten met auto-immuunziekten zoals type I diabetes, lupus en reumatoïde artritis minder goed zullen reageren op AAV-2 gebaseerde gentherapie dan andere patiënten en dat verrassend genoeg juist bij deze groep patiënten efficiënte immuunsuppressie mogelijk noodzakelijk zal blijken om de gevonden immuunrespons te omzeilen.

Door de studie van Zhang en collega's is er een aantal vragen waar we nu het antwoord nog niet op weten en richting zullen geven voor toekomstig onderzoek. Wat voor effecten heeft activering of suppressie van het immuunsysteem van de gastheer op de transductie-efficiëntie en genexpressie van verschillende virale vectoren? Dit is niet alleen relevant voor auto-immuunziekten, maar ook voor gentherapie gericht op manipuleren van het immuunsysteem bij behandeling van kanker, virussen en andere pathogenen. Maar ook wat zijn de effecten van genetische achtergrond van ontvangers van vectoren op de resultaten van systemische gentherapie versus genexpressie behaald met *ex vivo* getransduceerde cellen en weefsels? De complexiteit van gastheer-vectorinteracties is nog onvoldoende onderzocht. Verdere studies zullen in eerste instantie gedaan worden met goed gedefinieerde muizenstammen, maar uiteindelijk ook bij mensen nader bestudeerd worden.

Beperken risico's insertiemutagenese

In hoofdstuk 4 wordt nader ingegaan op het optreden en de mogelijke oorzaken van insertiemutagenese bij twee SCID patiënten. Het absolute risico van klinische manifeste insertiemutagenese bij gebruik van retrovirale en andere integrerende vectoren is op dit moment onbekend en kan alleen bepaald worden door uitgebreide observatie van meer

patiënten en het ontwikkelen van bona fide en klinisch relevante modellen om verdere toxiciteitsstudies uit te voeren.

Extra aandacht is er nu voor het ontwerpen van virale vectoren waarbij het risico op mutagenese geminimaliseerd wordt. Dit gebeurt bijvoorbeeld door de promoteractiviteit te beperken tot relevante celtypen en door gebruik te maken van zogenaamde isolatoren ('insulators'), zodat promoteractiviteit binnen het domein van het therapeutisch transgen blijft. Verder wordt gewerkt aan gerichte plaats specifieke integratie, zodat er een meer gecontroleerd proces optreedt. Tot op heden zijn alleen virale vectoren gebaseerd op retrovirussen (inclusief lentivirussen) gebruikt voor stabiele introductie van een transgen in het chromosoom. Traditioneel werden adenovirussen, pokkenvirus en herpes simplex-1 virussen beschouwd als niet integrerende virussen, deze indeling is echter niet meer zo absoluut door verdere ontwikkeling van (hybride) vectoren. Tegenover het nadeel van mogelijke insertiemutagenese, bestaat er immers ook een duidelijk voordeel van chromosomale insertie, namelijk dat het transgen behouden blijft bij klonale uitgroei van getransduceerde cellen. Daarom worden er ook studies gedaan aan andere gentransfersystemen om deze juist meer te richten op integratie van het transgen [Wang *et al.*, 2002]. Fysisch chemische methoden leiden maar in een klein deel van de gevallen tot stabiele transgeninsertie ($< 10^{-4}$). Dit kan verhoogd worden indien dit gecombineerd wordt met endonucleasen van retrotransposons of plaats-specifieke integrases. Recente ontwikkelingen in adenovirusvectortechnologie, waaronder ook adeno-geassocieerde virus/adenovirus hybride vectoren, zullen het vermogen om te integreren en hiermee stabiele gentransfer leiden verhogen [Harui, 1999, Mitani & Kubo, 2002, Shayakhmetov *et al.*, 2002, Goncalves *et al.*, 2004].

3.3 Genetische achtergrond

Er komen steeds meer aanwijzingen dat er rekening gehouden dient te worden met heterogeniteit van bepaalde patiëntenpopulaties. Dit volgt niet alleen uit de paragraaf over het immuunsysteem. Bij (kanker)geneesmiddelen wordt er ook al in een aantal klinische studies gecontroleerd welke genetische achtergrond de betreffende patiënten hebben. Hiermee kan worden voorzien dat bepaalde subgroepen patiënten bijvoorbeeld niet onnodig chemotherapie hoeven te ondergaan. Een recent verschenen artikel over dit onderwerp heet dan ook 'Selecting the right patient for tumor therapy' [Arteaga, 2004]. Hoe beter patiënten van elkaar onderscheiden kunnen worden in de zin voor wie baat bij de (kanker)therapie zullen hebben, leidt overigens ook weer tot studies waarbij eerdere effectiviteit van een therapie kan worden

aangetoond. Meer aandacht voor deze zaken bij genterapiestudies zal ook de genterapieresultaten uiteindelijk ten goede komen.

3.4 Systemische productie van therapeutische eiwitten

Naast aandacht voor optimalisatie van vectoren zijn er ook nieuwe ontwikkelingen op het gebied van doelwitorganen. Veel therapeutische transgenen zijn bedoeld voor correctie van systemische eiwitdeficiënties en worden ingebracht in ofwel kritische organen, zoals lever en longen [Aurichio *et al.*, 2002, Engelhardt 2002], of een weefsel dat fysiologisch gezien niet bestemd is voor secretie, zoals spierweefsel en neus [Lu *et al.*, 2003, Griesenbach *et al.*, 2002]. Recent is laten zien dat speekselklieren een geschikt alternatief kunnen zijn. Humane speekselklieren produceren royale hoeveelheden speeksel per dag en scheiden aanzienlijke hoeveelheden eiwit uit in zowel het maagdarmkanaal als in het bloed. Voordeel is dat speekselklieren goed ingekapseld zijn en niet kritisch voor het bestaan zijn. Toediening van 10^9 AAV met hEPO in muizenspeekselklieren zorgden voor serum hEPO tot 42 weken (laatste tijdpunt studie) [Voutetakis *et al.*, 2004].

3.5 Monogene ziekten

De meest voor de hand liggende toepassing van genterapie is behandeling van monogene ziekten. Dit is ook gebleken uit het eerste succes van genterapie. De genezing van patiënten met X-linked Severe Combined Immunodeficiency Disease (SCID) [Carazzano-Calvo *et al.*, 2000]. De kans is groot dat genterapie van andere immuundeficiënties succesvol zal zijn. Dit geldt helemaal voor ziekten waarbij de genetische gemodificeerde cellen een groeivoordeel hebben. Voorbeelden hiervan zijn diverse vormen van SCID. Er zijn goede resultaten laten zien bij ADA-SCID patiënten bij wie ofwel lymfocyten- of stamcelgenterapie heeft geleid tot transgen expressie gedurende verschillende jaren. Dierstudies van RAG-2 [Yates, 2002] en JAK-3 deficiënte SCID [Bunting *et al.*, 2000] laten positieve resultaten zien [Auiti *et al.*, 2002].

Een voordeel van een aantal monogene ziekten is dat lage expressieniveau's (1-5% van het normale expressieniveau) al positieve effecten hebben op het ziektebeeld. Een bekend voorbeeld is hemofilie. Behandeling van hemofilie B patiënten met factor IX via adeno-geassocieerde virale vector heeft zelfs al in een fase I studie positieve resultaten laten zien [Kay *et al.*, 2000].

Andere voorbeelden zijn lysosomale stapelingsziekten [Cheng & Smith, 2003]. Lysosomale stapelingsziekten zijn een groep van meer dan 40 erfelijke ziekten die veroorzaakt worden

door deficiëntie van één of meerdere lysosomale enzymen. Verlies van enzymactiviteit leidt tot progressieve stapeling van onafgebroken substraten in de lysosomen uiteindelijk leidend tot cel- en weefselbeschadiging, orgaandisfunctie en bij sommige vormen tot vroege dood. Ofschoon de eerste klinische studies met *ex vivo* gentherapie ineffectief waren, bestaat er hoop op positieve resultaten in de toekomst. Dit is gebaseerd op de verwachting dat een lage en ongereguleerde expressie van de aangedane lysosomale enzymen voldoende zou zijn om een aantal lysosomale stapelingsziekten te corrigeren.

3.6 Kanker

De meerderheid van de klinische gentherapiestudies betreffen kankerpatiënten. In 2004 is het eerste geregistreerde gentherapieproduct op de markt gekomen. Op 16 oktober 2003 heeft Shenzhen SiBiono GenTech (Shenzhen, China) voor Gencidine de registratie verkregen van de Chinese FDA. Dit product betreft recombinant adenovirus-p53 voor toepassing bij hoofd- en hals plaveisel celcarcinoom (HNSCC). Er zijn ruim 5 jaar klinische studies aan voorafgegaan en als enige bijwerking van Gencidin wordt zelf-limiterende koorts gemeld. Na 8 weken van combinatietherapie van radiotherapie en wekelijkse gentherapie-injecties, trad bij 64% van late-stage HNSCC tumoren complete regressie op en 32% liet partiële regressie zien. Het is echter niet bekend wat de resultaten zijn indien alleen radiotherapie zou worden toegepast (Pearson *et al.*, 2004)

Virotherapie biedt nieuwe mogelijkheden voor behandeling van kanker. Doordat gentherapie op een andere manier tumorcellen doodt dan straling of chemotherapie kunnen additieve effecten optreden. Dit wordt mogelijk veroorzaakt doordat aanvullende therapie zorgt voor een verandering van de tumorstructuur waardoor tumorcellen weer makkelijk toegankelijk worden voor virussen. Onderwerpen die op dit moment actueel zijn zijn de immuunrespons, systemische verdeling en intratumorverspreiding. Ofschoon de immuunrespons virusrepletie uiteindelijk tegen zal gaan en verspreiding in immuuncompetente mensen beperkt zal worden, staat hiertegenover dat immuunrespons ook kan leiden tot een verhoogd antitumoreffect. Naast inzetten van virale vectoren wordt er in klinische studies ook gebruik gemaakt van tumor specifiek repletie selectieve bacteriën zoals *Salmonella typhimurium*. Recent worden er behalve adenovirussen en herpesvirussen steeds meer andere virussen toegepast, bijvoorbeeld vacciniavirus, mazelenvirus en reovirus. Naast gebruik van virussen die van nature humane cellen kunnen infecteren wordt bijvoorbeeld ook gewerkt aan autonome parvovirussen. Dit zijn kleine enkelstrengs DNA virussen zonder envelop. Zij komen in veel species voor en hebben oncolytische eigenschappen. Het kattenparvovirus (feline panleukopenia virus, FPV)

heeft een alpha (v) integrin bindingspeptide in het capsid ingebouwd, waardoor bepaalde (maar niet alle) tumorcellen geïnfecteerd kunnen worden [Maxwell *et al.* 2001].

3.7 Neurologische aandoeningen

Op termijn valt te verwachten dat lentivirale gentransfer in het beschadigde perifere zenuwstelsel zal worden toegepast in de kliniek om regeneratie te bevorderen. In eerste instantie zal behandeling *ex vivo* plaatsvinden, maar met het verbeteren van de techniek zal dit verschuiven naar *in vivo* gentherapie. Voor het perifere zenuwstelsel zal er geen tussenstap (na experimenten in rat en *ex vivo* humaan) nodig zijn. Er is op dit terrein al veel ervaring opgedaan door de neurochirurg. Voor het centraal zenuwstelsel is de overstap van diermodel naar mens echter veel verder weg.

Er kunnen drie studies genoemd worden die de zogenoemde ‘cutting edge’ vormen van gentherapie in de hersenen bij niet maligne aandoeningen. De eerste studie betreft een apenstudie van een Parkinsonmodel. Lentivirussen met ‘glial cell-line derived neurotrophic factor’ (GDNF) werden in het striatum en subthalamus nucleus geïnjecteerd [Kordower, 2000]. De eerste resultaten waren positief, functionele afwijkingen werden hersteld en nigrostriatale degeneratie werd voorkomen. Ofschoon dit nog niet gepubliceerd is, blijken er nu echter ook allerlei bijwerkingen op cognitie waargenomen te zijn en zijn er andere psychologische effecten. Deze bijwerkingen worden overigens veroorzaakt door het molecuul GDNF en zijn niet het gevolg van de gentherapieprocedure (persoonlijke communicatie). De tweede studie betreft een eerste gentherapieprotocol voor Parkinsonpatiënten (betrokken onderzoeker is Michael Kaplitt van Cornell University). Inmiddels zijn bij de eerste patiënt in de subthalamus nucleus adenogeen geassocieerde virussen met het enzym glutaminezuur decarboxylase (GAD) (het snelheidsbeperkende enzym voor synthese van de inhibitoire neurotransmitter gamma-aminobutyrataanzuur, GABA) geïnjecteerd.

De derde studie betreft Alzheimerpatiënten. Na uitgebreide testen van verschillende protocollen in ratten en apen zijn er nu 8 patiënten behandeld. Hierbij worden autologe fibroblasten getransplanteerd die *ex vivo* getransduceerd zijn met retrovirussen waarin de ‘nerve growth factor’ (NGF) aanwezig is. De resultaten zijn tot op heden nog niet gepubliceerd.

3.8 Overige aandoeningen

Met het voltooiën van het humane genoomproject en de toenemende kennis van mechanismen van acute, polygenetische en niet-genetische ziekten zullen er in de toekomst voor steeds

meer verschillende toepassingen genterapie ontwikkeld worden. Voorbeelden zijn astma, doorbloedingsstoornissen en infecties. Genterapie voor acute ziekten vereist vectoren die terminale uitgedifferentieerde cellen efficiënt transduceren en snel, maar gedurende korte tijd (van dagen tot weken) het transgen tot expressie brengen [review Factor, 2001].

Ontwikkelingen in adenovirale vectoren en plasmid DNA technologie hebben transductie-efficiëntie en expressie in myocard en skeletspierweefsel verbeterd. Verder zijn adenogeassocieerde virussen en liposomencomplexen aangepast waardoor efficiëntie verhoogd is in preklinische studies van angiogenese voor myocard en vaatziekten. Inmiddels hebben fase I en II klinische studies bij patiënten met hartziekten en perifere vaatziekten veiligheid aangetoond met aanwijzingen voor klinische effectiviteit voor therapeutische angiogenese.

Nieuwe ontwikkelingen zijn het verhogen van transductie-efficiëntie en het verminderen van toxiciteit ten gevolge van ontstekings- en immuunreacties. Non-virale vectortechnologie zal efficiënter gemaakt worden waarbij veiligheidsaspecten die bij virale vectoren optreden geen rol spelen. De methoden van toediening van angiogenetische agentia en de timing van de therapie zullen kritische factoren zijn in de strategie van therapeutische angiogenese [review Khan *et al.*, 2003].

Verder zijn er genterapiestudies gedaan ter behandeling van vetzucht. Een eenmalige injectie van adenogeassocieerde virussen met leptine in de hersenen van jonge ratten liet een reductie in lichaamsgewicht zien [Dhilton *et al.*, 2001, Beretta *et al.*, 2002]. Ofschoon de eerste resultaten positief zijn staan er nog veel vragen open zoals mogelijke leeftijdseffecten, bij oude ratten wordt namelijk geen effect gevonden. Toepassing bij de mens is nog ver weg, intrathecale toediening is niet heel praktisch toepasbaar en de langetermijneffecten op hersenstructuur en functie zijn nog onbekend. Bovendien roept de onomkeerbaarheid van genterapie veiligheids- en toxiciteitsvragen op [Ahmia 2003]. Vanzelfsprekend speelt ook mee dat er alternatieven zijn en het geen acuut levensbedreigende aandoening betreft.

Dit jaar is er een complete uitgave van het tijdschrift Gene Therapy [11: 2004] gewijd aan orthopedie. Recent onderzoek heeft laten zien welke groeifactoren en andere genproducten in staat zijn tot het regenereren van orthopedisch weefsel (kraakbeen, ligament, intervertebrale schrijf, bot). Voordeel van gentransfer is lokale endogene synthese van authentiek geprocessed materiaal op de plaats van de beschadiging. Bovendien is voor weefselherstel langdurige genexpressie gewenst. Er zijn nog maar enkele klinische studies gestart die gentransfer naar de gewrichten betreffen. Onlangs is er een klinische studie in het Leids Universitair Medisch Centrum gestart voor het vastzetten van loszittende heupprothesen.

Artritis en (tussenwervel)schijfdegeneratie zijn zo veel voorkomend, pijnlijk en resistent tegen therapie dat nieuwe therapie gewenst is. Gentherapie wordt dan niet toegepast om een gendefect te compenseren, maar om therapeutische genproducten op de plaats van de aandoening aan te maken. Andere toepassingen betreffen osteoporose, trauma en sportgeneeskunde.

3.9 Overige ontwikkelingen

Nieuwe ziekte uitbraken

Naast de (allang) bestaande en bekende ziekten wordt de wereld regelmatig geconfronteerd met natuurlijke virusuitbraken of pathogene uitbraken (SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) en AI (Avian Influenza) alsook de dreiging van bioterrorisme (Ebola, hemorrhagic fever en Lassa virus) Dit begint als een lokaal probleem, maar kan in een korte tijd een mondiaal karakter krijgen. Er zijn veel ontwikkelingen op het terrein van de vaccins. De keuze voor een bepaald type vaccin wordt in sterke mate bepaald door de specifieke toepassing alsook door de technische haalbaarheid van productie- of opschalingsprocessen. Dit is van oudere technologieën (adenovirussen) beter bekend, terwijl er bij andere systemen nog veel ontwikkeling zal moeten gebeuren. Voordeel van een replicerend systeem is dat er minder uitgangsmateriaal nodig is, maar dit roept weer veiligheidsvragen op. Door allerlei ontwikkelingen in de wereld veranderen de (on)mogelijkheden continu. Een voorbeeld is de inenting van de Amerikaanse bevolking tegen pokken. Hierdoor zal toekomstige toepassing van MVA (modified vaccinia virus Ankara) vector last krijgen van al bestaande immuniteit in mensen.

Overheidsfinanciering

Vorig jaar is in Groot-Brittannië een zogenaamde White Paper over genetica gepubliceerd [Dep. of Health, 2003], bedoeld om ruim baan te geven aan integratie van genetica in de gezondheidszorg van Groot-Brittannië. Hieraan gekoppeld is een geldbedrag van £50 miljoen (verzekerd als 'nieuw geld'). Een deel hiervan is direct bestemd voor gentherapie: £2,5 miljoen verspreid over 5 jaar voor taaislijmziekte en tot £3 miljoen voor monogene ziekten. Verder £4 miljoen voor verbetering van toegankelijkheid tot gentherapievectorproductie, een National Biomanufacturing Facility [<http://www.bionow.co.uk>] zal begin 2005 operationeel zijn. Tot slot nog relevant voor gentherapie is £1,25 miljoen voor een nieuw fonds bestemd voor ondersteuning, training in het buitenland. Dit initiatief wordt gezien als een erkenning

door de regering van de potentie van genterapie voor het substantieel verbeteren van de patiëntenzorg [Lemoine & Kirby, 2003].

Geld voor translationeel onderzoek en het wegnemen van barrières voor uitvoeren van klinische studies is beschikbaar gesteld in het programma Translationeel Genterapeutische Onderzoek van ZonMw. In totaal gaat het in Nederland om € 15,8 miljoen. Net zoals in Groot-Brittannië wordt dit als een positief signaal vanuit de politiek gezien. Ofschoon het om substantiële bedragen gaat, zullen er voor verdere vooruitgang ook grote(re) investeringen op de lange termijn nodig zijn. De kanttekeningen hierbij zijn de verdeling van het geld tussen fundamenteel onderzoek naar mechanismen en methodologie versus klinische toepassingen. Basaal onderzoek zal noodzakelijk blijven om nieuwe toepassingen te kunnen genereren en translationeel onderzoek te voeden.

Bedrijfsleven

In Nederland is er op dit moment één bedrijf dat zich geheel richt op genterapie: Amsterdam Molecular Therapeutics (AMT). Dit bedrijf is in 1998 opgericht door onderzoekers van de Universiteit van Amsterdam in het Academisch Medisch Centrum. In maart 2004 heeft AMT voor hun adeno-geassocieerde virale vector met lipoproteïne lipase (LPL) product voor de behandeling van LPL deficiëntie de status van weesgeneesmiddel toegewezen gekregen van de Europese Commissie. LPL is een belangrijk enzym betrokken bij de klaring van triglyceriden van het plasma. Mensen die deficiënt zijn in LPL ontwikkelen chronische pancreatitis, uiteindelijk leidend tot diabetes mellitus. Afgezien van het drastisch reduceren van vet in het dagelijkse dieet is er geen behandeling mogelijk. In twee verschillende LPL deficiënte diermodellen is het mogelijk gebleken om door middel van adeno-geassocieerde virale vector gemedieerde LPL genterapie de triglyceridespiegels op een normaal niveau te krijgen. AMT verwacht de eerste klinische studie in medio 2005 te starten.

Informatievoorziening publiek

In maart 2004 hebben de NIH en FDA een via het web toegankelijke database met betrekking tot humane gentransfer gelanceerd (<http://www.gemcris.od.nih.gov/>). Dit zogenoemde Genetic Modification Clinical Research Information System (GeMCRIS) is zowel bestemd als publieke informatiebron alsook een belangrijk nieuwe elektronische mogelijkheid om bijwerkingen van genterapiestudies te melden en analyseren door het onderzoeksveld. Deze openheid heeft als doel tegemoet te komen aan de zorgen van het publiek en patiënten over veiligheid en tegelijkertijd de ruimte te geven aan het genterapieveld om zich verder te

ontwikkelen. Hierbij kan wel een kanttekening geplaatst worden, bedrijven zijn niet verplicht om negatieve resultaten openbaar te maken om zo te voorkomen dat hun concurrentiepositie beschadigd zou raken.

Tijdens de afgelopen jaarlijkse bijeenkomst van de Gene Therapy Advisory Committee (GTAC) in november 2003 werd teruggekeken op 10 jaar genterapie in Groot-Britannië. Net zoals in de rest van de wereld is de conclusie dat er een verschuiving is opgetreden van de oorspronkelijk behandeling van monogene ziekten, zoals taaislijmziekte, naar kanker, op dit moment 74% van alle studies in Groot-Brittannië. Bij de afsluiting van de GTAC bijeenkomst werd door Geoff Watts, een wetenschappelijk broadcaster, opgemerkt dat de media in staat zijn om de publieke mening over genterapie te maken of te breken en dat dit ook een niet te onderschatten factor kan zijn op de toekomstige ontwikkelingen van genterapie [Jacoby, 2004]. In Nederland wordt op beperkte schaal via patiëntenverenigingen relevante doelgroepen direct geïnformeerd. En in navolging van de bestaande Café Scientifique in 11 landen, worden er sinds dit jaar in Nederland Orphan Cafés georganiseerd [Tent, 2004]. Verder kan via de websites van genterapieverenigingen (zie *Tabel 5*) actuele informatie over genterapie worden gevonden. Het verder bereiken en informeren van een breed publiek om realistische verwachtingen te krijgen van genterapie blijft een belangrijk punt voor de toekomst.

Tabel 5. Overzicht van een aantal genterapieverenigingen, waarop actuele informatie over genterapie is te vinden en programma's van toekomstige congressen.

NVGT – <i>Nederlandse Vereniging voor Genterapie</i>	www.nvgt.nl
ESGT – <i>European Society of Gene Therapy</i>	www.esgt.org
ASGT - <i>American Society of Gene Therapy</i>	www.asgt.org

Afsluitende opmerkingen

Bij voorspellingen over de toekomst willen mensen, en zeker patiënten en investeerders, graag reacties met concrete (jaar)getallen. Deze staan niet in dit rapport. Wel kunnen historische getallen informatief zijn (zie *Tabel 6*). Hieruit wordt duidelijk dat er een flinke periode zit tussen de ontdekking van het DNA en de uiteindelijke voltooiing van het humane genoom project (ruim 50 jaar). Hetzelfde geldt voor de tijd tussen de eerste efficiënte

overdracht van naakt DNA naar cellen en de uiteindelijke toepassing bij de eerste patiënten (ruim 15 jaar). Toevalligerwijs heeft het dezelfde tijd geduurd dat het mogelijk werd om via homologe recombinatie een gen te vervangen in cellen. Uiteindelijk zat er bijna 30 jaar tussen de eerste efficiënte genoverdracht naar cellen en de eerste genezing van patiënten door genterapie. De recente afronding van het humane genoomproject en de ontwikkeling van allerlei databanken (met data afkomstig uit zowel humane als dierenstudies) zullen uiteindelijk leiden tot een beter inzicht en daarmee de succesansen van genterapie aanzienlijk vergroten. Het gaat daarbij zowel om klinische data als om resultaten uit fundamenteel onderzoek naar werkingsmechanismen van ziekten en genterapievectoren. De richting en de snelheid van ontwikkelingen zullen mede bepaald worden door de financieringsmogelijkheden.

Tabel 6. Overzicht van historische mijlpalen in DNA onderzoek.

1943	Avery toont DNA aan als drager van erfelijke informatie
1973	efficiënte overdracht van naakt DNA naar cellen gelukt (<i>in vitro</i>)
1989	behandeling eerste genterapiepatiënt
1989	genherstel in zoogdiercellen via homologe recombinatie gelukt (<i>in celkweek</i>)
2000	eerste genezing van patiënt door genterapie
2002	voltooiing eerste versie humane genoomproject

4 Risico analyse

In het eerste deel van dit hoofdstuk wordt het optreden van leukemie bij twee patiënten met X-linked SCID besproken. Hierbij wordt ingegaan op de algemene risicofactoren van insertiemutagenese, het effect van het gebruikte transgen en de rol van de getransduceerde celpopulatie. Bovendien wordt nader ingegaan op specifieke factoren als de LMO2 integratieplaats, X-linked SCID en de leeftijd. Deze laatste factoren kunnen voor een ander ziektebeeld vervangen worden door een andere specifieke integratieplaats, de rol van het immuunsysteem en andere patiëntgebonden factoren.

In het tweede deel van dit hoofdstuk worden mogelijke risico's op een meer globale manier besproken. Om gentherapie effectiever te maken wordt gewerkt aan verschillende strategieën zoals het ontsnappen aan het immuunsysteem en ontwerpen van selectief replicerende systemen. De verschillende ontwikkelingen in vectortechnologie leiden tot specifieke veiligheidsvragen. Tot slot wordt nog ingegaan op biologische veiligheidsrisico's die losstaan van gebruikte vectoren, maar wel degelijk een rol kunnen spelen.

Overigens staan er in dit hoofdstuk discussieonderwerpen vermeld, maar geeft het geen 'antwoorden'. Bij beslissing om gentherapie toe te passen zal er voor de individuele patiënt een afweging gemaakt worden tussen de potentiële risico's en de kans op klinische verbetering. Wanneer men een globale indeling naar veiligheidsniveau's maakt dan wordt er vaak onderscheid gemaakt tussen (1) niet-viraal (2) replicatie defectieve vectoren en (3) replicerende systemen.

4.1 Risico analyse leukemie bij X-SCID patiënten

Leukemie

Het feit dat retrovirussen door integratie in het chromosoom kanker kunnen veroorzaken is al langer bekend. Bij replicatie van endogene retrovirussen in muizen treden er meerdere integraties per cel op, wat kan leiden tot tumorvorming. De analyse van die retrovirale insertieplaatsen wordt gebruikt voor het ontdekken van oncogenen. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van grote databanken. Een voorbeeld zijn de sequenties van meer dan 3000 retrovirale integratieplaatsen die werden gecloneerd van door retrovirussen geïnduceerde hematopoietische tumoren in muizen (<http://RTCGD.ncifcrf.gov>). Echter, bij geen van de

studies waarbij muizen retroviraal getransduceerde hemopoietische stamcellen ontvingen was ooit gerapporteerd dat er tumorvorming was opgetreden. Verder zijn er meer dan 250 patiënten betrokken in 40 klinische studies van gentransfer naar hemopoietische stam- en voorlopercellen. Bij geen van hen is vastgesteld dat er tumoren zijn geïnduceerd. Desalniettemin werd bij twee van de tien behandelde X-SCID patiënten leukemie vastgesteld. Dit toont aan dat het niet slechts gaat om een hypothetisch gevaar, maar om een reëel risico waarmee in de toekomst rekening gehouden dient te worden [Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2002]. In diezelfde periode verschijnt het eerste artikel waarin tumorvorming wordt beschreven door oncogenactivatie ten gevolge van een geïntegreerde retrovirale vector [Li *et al.*, 2002]. In één van vijf muizen die retroviraal getransduceerde beenmergcellen ontvingen ontstonden er tumorcellen. Deze kwamen aan het licht toen het gemodificeerde beenmerg werd door getransplanteerd naar tweede ontvangers. Alle muizen die beenmerg ontvingen van de eerste ontvanger ontwikkelden acute myeloïde leukemie [Li *et al.*, 2002]. Uit deze resultaten blijkt dat de kans op tumorinductie na retrovirale gentherapie weliswaar klein, maar niet verwaarloosbaar is.

LMO2 integratieplaats

Het meest opvallend van de twee leukemieën is dat in beide gevallen de vector vlakbij of in het *LMO2* gen is geïntegreerd. *LMO2* is een gen dat codeert voor een leukemogeen kankereiwit, maar overexpressie veroorzaakt geen snelle leukemievorming in immuuncompetente transgene muizen. Verder is *LMO2* niet een van de veel voorkomende geactiveerde oncogenen in spontane humane T-celleukemieën. Of het *LMO2* locus een veel voorkomende retrovirale integratieplaats is in humane CD34⁺ cellen, of in ieder geval bij patiënten met X-linked SCID, of dat andere cofactoren nodig zijn om leukemogenese te veroorzaken bij de patiënten is onbekend. Ofschoon deze factoren met elkaar samenhangen, is het van belang om onderscheid hiertussen te kunnen maken, omdat zij verschillende implicaties hebben voor (toekomstige) risico analyses.

Transgen IL2RG

Op dit moment is nog onbekend of het gebruikte transgen, de gewone ('common') γ keten van de interleukine-2 receptor (γ_c of IL2RG) kan optreden als co-factor in transformatie. In eerste instantie werden er geen problemen verwacht van IL2RG dat normaliter op veel hemopoietische cellen en lymfocyten tot expressie wordt gebracht. Bovendien zijn er andere specifieke receptoreiwitten in het IL2RG heteromere complex nodig voor signaaltransductie.

Desalniettemin codeert IL2RG voor een cytokinereceptorketen die subtiele proliferatie of anti-apoptotische effecten kan veroorzaken, waardoor transformatie in combinatie met insertie activering van LMO2 kan optreden. Hierbij gaat het om een unieke interactie tussen het specifieke therapeutische transgen en het gen dat geactiveerd wordt door insertiemutagenese. Onlangs is in de Mouse Retroviral Tagged Cancer Gene Database (<http://RTCGD.ncifcrf.gov>) een leukemie gevonden waarbij retrovirale integratie was opgetreden in zowel LMO2 als IL2RG [Davé *et al.*, 2004, Berns, 2004].

Naast interactie van het transgenproduct met het product van het specifieke gen bij de integratieplaats, kan men de mogelijkheid niet uitsluiten dat antiapoptotische effecten van het γ_c transgen leiden tot verhoogde celoverleving. Dat kan resulteren in een abnormale proliferatievoordeel van sommige rijpe T-cellen. Een dergelijk mechanisme zou verder uitgezocht dienen te worden in dierstudies, dit geldt met name wanneer het geïntroduceerde gen een groeivoordeel heeft ten opzichte van niet getransduceerde cellen [Williams & Baum, 2003].

Rol getransduceerde celpopulatie

Ofschoon de absolute celaantallen van autologe CD34⁺ cellen die de baby's ontvingen tijdens therapie niet uitzonderlijk hoog waren, was dit op een per kilogram basis meer dan een tienmaal hoger dan wat volwassen patiënten krijgen toegediend. Hiernaast wordt aangenomen dat hemopoietische stamcellen slechts 1% van de CD34⁺ celpopulatie uitmaken. Verdere opzuivering van de doelcellen kan dan ook het aantal getransduceerde cellen omlaag brengen. Met het verminderen van het aantal getransduceerde cellen zal ook de kans op insertiemutagenese afnemen.

Immuunsysteem en SCID

Er zijn veel experimentele data die aangeven dat tumoren in normale muizen niet zo goed zouden aanslaan als in immunodeficiënte muizen. Bij mensen is de associatie tussen Epstein-Barr virus (EBV)-geassocieerde lymfoproliferatieve ziekte en immuungecompromitteerde patiënten goed beschreven. In het geval van hematologische tumoren is immuunsurveillance door NK-cellen speciaal belangrijk. De patiënten betrokken in de studie van Cavazzana-Calvo *et al.* waren de NK-celaantallen wel verbeterd, maar niet tot normale niveau's. Dit kan betekenen dat genterapieontvangers met een immuundeficiëntie een groter risico lopen om tumoren te ontwikkelen dan immuuncompetente individuen.

Leeftijd

Verder is het opmerkelijk dat de twee patiënten de jongste (1-3 maanden) waren in deze klinische studie van SCID gentherapie. Op dit moment is de invloed van leeftijd op gevoeligheid voor insertieoncogenese nog onbekend en kan mogelijk samenhangen met de specifieke therapie.

4.2 Globale risico analyse

4.2.1 Insertiemutagenese

Het feit dat insertiemutagenese meer is dan een slechts hypothetisch risico werd duidelijk met het optreden van leukemie bij twee X-SCID patiënten. Ofschoon de kans op het ontwikkelen van een tumor veroorzaakt door insertiemutagenese relatief klein is in vergelijking met enkele andere gevestigde medische behandelingen zoals straling of chemotherapie blijft het belangrijk om verdere ontwikkelingen te volgen. Enerzijds worden huidige integrerende vectoren veiliger gemaakt, anderzijds worden van oorsprong niet-integrerende vectoren juist voorzien van integrerende eigenschappen.

Alle gentransfermethoden die leiden tot integratie van DNA in het chromosoom hebben een risico op mutagenese. Behalve in het geval dat het geïntroduceerde gen het defectieve gen zou vervangen. Dit zal echter in de nabije toekomst niet realiseerbaar zijn door de lage efficiëntie van het proces. Niet voor alle gentherapietoepassingen is deze aanpak relevant. Integratie van DNA in het chromosoom kan leiden tot inactivering van een tumorsuppressorgen of activatie van een proto-oncogen.

Retrovirussen integreren niet willekeurig, maar hebben een voorkeur voor integratie in of vlakbij actieve genen. Retrovirussen kunnen cellulaire genen over grote afstanden (meer dan 10 kb) activeren. Uitgaande van de aanwezigheid van meer dan 100 proto-oncogenen in het humane genoom zal oncogen disregulatie in 0,1 tot 1% van alle retrovirale gentransfer gebeurtenissen optreden. Dit betekent dat er meer patiënten zijn die cellen hebben met retrovirale integraties in de buurt van oncogenen, ofschoon dit zich niet uit in een klinische manifestatie [Kohn et al., 2003].

Voor vele toepassingen is integratie van het transgen noodzakelijk om langdurige aanwezigheid te bewerkstelligen. Daarom worden er ook studies gedaan naar genoverdrachtsystemen, juist met als doel om integratie van het transgen te forceren. Hierbij dient een afweging gemaakt te worden met het hiermee geassocieerde risico.

Overigens geldt een verhoogd risico op het ontstaan van kanker als gevolg van medisch handelingen niet alleen voor gentherapie met integrerende vectoren maar ook voor andere medische handelingen, zoals het toepassen van straling of chemotherapie met DNA-beschadigende middelen, of langdurige immuunsuppressie [Moolten & Cupples, 1992].

4.2.2 Transgen

Bijwerkingen die samenhangen met gebruikte transgen worden beïnvloed door de specificiteit en regulering van het expressieniveau. Dit zijn risico's die ook met andere technieken dan gentherapie kunnen optreden.

Tot nu toe speelde de vraag over toxiciteit van transgen vooral bij toepassingen binnen de virotherapie. Virale vectoren zijn veelal specifiek gericht op tumorcellen, maar wat is de kans op toxiciteit van transgen dat tot expressie komt in gezonde cellen? Een prodrug activerend enzym leidt mogelijk tot weinig of geen toxiciteit bij afwezigheid van het relevante prodrug, terwijl een cytokine zoals tumornecrosisfactor, dat betrokken is bij ontstekingen, kan leiden tot serieuze lokale of zelfs systemische toxiciteit.

In de discussie over het ontstaan van leukemie bij de twee SCID patiënten is recent ook meer gepubliceerd over de mogelijke rol van het gebruikte transgen.

Het is de dosis die bepaalt of iets schadelijke effecten heeft. In de praktijk blijkt het niet eenvoudig om een strict gereguleerde eiwitexpressie te krijgen na gentransfer. Een te laag expressieniveau ten opzichte van de normale gezonde situatie kan overigens al leiden tot therapeutisch effect. Enzymdeficiënties (zoals ADA-SCID) en stapelingsziekten (zoals Gaucher) kunnen al baat hebben bij lage expressieniveau's (1-5% van het normale expressieniveau). Een te hoog expressieniveau kan echter leiden tot nieuwe problemen. Bij een overexpressie van globineketens bij de behandeling van thalassemie leidt dit bijvoorbeeld tot een nieuwe thalassemie, de α - en β -ketens dienen immers in balans te zijn.

Voor de volgende vier genen is in een review artikel uitgewerkt wat de mogelijke risico's zijn ten gevolge van transgenexpressie: HOXB4 (homeodomein transcriptiefactor betrokken bij de regulatie van de hematopoietische poolgrootte, om repopulerend vermogen van hematopoietische cellen te vergroten), MDR1 (multidrugresistentie 1 transportpomp, om cellen hoge dosis van chemotherapeutica te laten overleven), dLNGFR (cytoplasmatisch gedeleteerde lage affiniteit zenuwgroeifactorreceptor, gebruikt als celmarker) en de CD40 ligand (voor behandeling van X-linked hyper-IgM syndroom) [Baum *et al.*, 2003]. Speciale aandacht zou besteed moeten worden aan moleculen die betrokken zijn in cellulaire signaaltransductie netwerken zoals sommige moleculen die nodig zijn voor correctie van

erfelijke aandoeningen, moleculen die werken als oppervlakte markers of artificieel induceerbare eiwitten die cellulaire proliferatie of differentiatie beïnvloeden.

Ook de resultaten uit de eerste studies bij Alzheimer en Parkinsonpatiënten wijzen op het belang van goede kennis van het werkingsmechanisme van het gebruikte transgen en de effecten van expressieniveaoverschillen. Hoe beter men op de hoogte is van de betreffende werkingsmechanismen, hoe beter men een risico analyse voor de betrokken patiënt kan maken.

4.2.3 Interacties met immuunsysteem

Het immuunsysteem zorgt voor het opruimen van virale vectoren en werd om deze reden onderdrukt in patiënten zodat vectoren langer konden persisteren. Deze strategie is min of meer verlaten en nu worden virale vectoren zelf aangepast om het immuunsysteem van de patiënt te ontwijken. Hoe minder invloed het immuunsysteem kan uitoefenen op het controleren van virale vectoren, hetzij door directe onderdrukking, hetzij door aanpassing vectoren, hoe groter de kans is op virulentie.

Bij mensen met een immuundeficiëntie of een onderdrukt immuunsysteem persisteren virussen veel langer. Door nu de immunogeniteit van gentherapievectoren te verminderen kan de effectiviteit bij immunocompetente mensen verhoogd worden.

Er zijn veel varianten mogelijk voor het principe om het immuunsysteem te ontwijken en is toepasbaar op uiteenlopende virale vectoren. Bij de risico analyse van dergelijke vectoren dient ook gekeken te worden naar het gebruikte transgen, eventuele combinatietherapieën (zoals bestraling en chemotherapie) en het immuunsysteem van de betreffende patiënt. In eerste instantie zullen risico's betrekking hebben op de patiënt, maar gevolgen voor het milieu kunnen niet uitgesloten worden. Een paar jaar geleden was er veel aandacht in de wetenschappelijke en algemene pers over de creatie van een zogenoemd 'killervirus'. Infectie van een recombinant pokkenvirus met IL-4 zou geleid hebben tot onverwachte lethale effecten. Echter, analyse van beschikbare gegevens maakte duidelijk dat de opgetreden hoge virulentie voorzien had kunnen worden [Müllbacher & Lobigs, 2001]. Dit incident onderstreept het belang van een goede analyse van alle beschikbare relevante data.

4.2.4 Vectorontwikkelingen

De productie- en testsystemen van virale vectoren worden steeds verder geoptimaliseerd, waardoor het optreden van replicatie competente virale vectoren geminimaliseerd wordt. Het zal voor zich spreken dat het verstandig is om de ontwikkelingen op het gebied van replicatie

competente virale vectoren ook in de toekomst te blijven volgen om goede risico analyses te kunnen maken.

In de hoofdstukken 1 en 3 wordt vectortechnologie in meer detail besproken. Hier zullen niet alle verschillende virustypen besproken worden, bovendien is het goed mogelijk dat er in de toekomst nog weer nieuwe virustypen gebruikt gaan worden. Wel worden hier een aantal algemene discussiepunten en enkele voorbeelden genoemd. Risico's van virale vectoren kunnen geschat worden door een vergelijking te maken met het oorspronkelijke virus. Wat is hiervan bekend bij de mens? Risico's zullen minder worden wanneer virale vectoren specifiek geworden zijn, alleen nog maar bepaalde celtypen infecteren en niet meer repliceren. Risico's nemen toe bij verbreding van het cel en/of weefseltropisme van virale vectoren. Dit kan niet alleen gevolgen hebben voor de patiënt maar ook voor het milieu. Behoedzaamheid moet met name worden betracht bij het gebruik van virale vectoren waarvan het gastheerbereik is uitgebreid van de mens naar andere diersoorten of vice versa. Dit betekent dat dergelijke virussen zich gemakkelijk zouden kunnen verspreiden en door recombinaties nieuwe varianten zouden kunnen ontstaan. Het zal evident zijn dat dit voor het milieu grote consequenties kan hebben. De natuur illustreert dit met recente virusuitbraken. In het algemeen kan gesteld worden dat de productietechnologieën van de reeds langer in gebruik zijnde virale vectoren verder ontwikkeld zijn en dat de kans op het ontstaan van replicatie competente vectoren hierdoor geminimaliseerd zijn. Verder is gebleken dat er grote verschillen kunnen bestaan tussen uiteenlopende celtypen voor wat betreft hun vermogen om virale vectoren te amplificeren. Zo zijn humane primaire T lymfocyten veel minder goed (2-4 log minder efficiënt) in staat om op MLV gebaseerde amfotrope replicatie competente retrovirale vectoren te amplificeren en zijn de ontstane virions voor meer dan 99% niet infectieus in vergelijking met NIH-3T3 cellen die juist vrijwel alleen infectieuze virions produceren [Ebeling *et al.*, 2003].

Modificatie vectortropisme

Bij de modificatie van het vectortropisme worden doorgaans twee principes gecombineerd: de productie van de ideale genterapievector en het toepassen van specifiek gerichte transductietechnologie om infectie te bewerkstelligen van alleen de gewenste doelcellen. De keuze wordt bepaald door de specifieke toepassingen en afhankelijk van het type modificatie kan het risico variëren van heel laag tot hoog. Belangrijk om mee te nemen in de risico analyse is of de modificatie gecodeerd wordt door de vector zelf.

Het tropisme van een virus kan op verschillende manieren aangepast worden, dit kan door gebruikmaking van andere serotypen. Andere voorbeelden zijn het inbouwen van een RGD peptide of een 'protein transduction domain' kortweg PTD, afkomstig van HIV Tat of door toepassing van adaptermoleculen. De elementen (zoals RGD) die de infectie van virussen meer algemeen verhogen zijn doorgaans risicovoller. Het Ebola virus glycoproteïne is gebruikt om retrovirussen te pseudotyperen. Het gebruik van lentivirussen die gepseudotypeerd zijn met een aangepast Ebola virus glycoproteïne liet zien dat dergelijke virussen interessant zouden kunnen zijn voor toepassing bij de behandeling van taaislijmziekte [Medina *et al.* 2003, Sanders, 2004]. Dit zijn slechts enkele voorbeelden om de verschillende mogelijkheden te illustreren. In de nabije toekomst zal de lijst van toepassingen verder uitgebreid worden wat het belang onderstreept om dit nader te analyseren.

Conditioneel replicerende vectoren

Conditioneel replicerende vectoren kunnen een therapie effectiever maken door specifiek in doelcellen te repliceren. De mate waarin deze specificiteit bereikt wordt, is bepalend voor mogelijke risico's. Bij dergelijke vectoren is een belangrijk aandachtspunt wat de beperkende factor in de vector is om te voorkomen dat de vector blijft repliceren.

De eerste generatie conditioneel replicerende vectoren, die in feite eenvoudige verzwakte virussen zijn (zoals ONYX-015 of HIV 1716), bleken bij patiëntenstudies veilig te zijn. Hierbij dient opgemerkt te worden dat virusrePLICATIE en -verspreiding door de tumor beperkt was. De risico's van nieuwe generatie vectoren die potentieel virulenter zijn dan het oorspronkelijke virus en waarbij de virusload kan toenemen tot mogelijk toxische concentraties zijn moeilijker in te schatten. Een manier om risico's te beperken is de inbouw van zelfmoordgenen. Bijvoorbeeld herpes simplexvirus afgeleide vectoren die het thymidinekinase gen bevatten, zodat gancyclovir toegediend kan worden indien virusverspreiding een probleem wordt. Waarbij dan ook belangrijk is om na te gaan hoe stabiel dit gen in de vector blijft na enkele replicatieronden in tumorcellen. Vanzelfsprekend dient er bij de productie van conditioneel replicerende virussen extra aandacht te zijn voor de kans op het ontstaan van wildtype virussen. Deze niet selectieve virussen zouden kunnen uitgroeien en daarmee gezond weefsel kunnen beschadigen.

Het gebruik van tumorspecifieke promoters garandeert niet dat er geen enkele expressie optreedt in gewone cellen. Gebruik van deze promoters in conditioneel replicerende vectoren of een transgen dat zowel in de tumor als gewone cellen toxisch is (zoals prodrug-activerende enzymen) kan consequenties hebben voor de veiligheid. Belangrijk is ook dat interpretaties

van weefselspecifieke promotoren soortafhankelijk kan zijn en dat preklinische data niet direct te vertalen zijn naar de klinische setting.

Er kan een duidelijk onderscheid gemaakt worden wanneer een virustropisme wordt beperkt tot slechts een subpopulatie van cellen of juist wordt uitgebreid naar nieuwe celtypen in vergelijking met het oorspronkelijke virus. Dit geldt helemaal bij systemische toepassingen. Bij conditioneel replicerende virussen dient ook rekening gehouden te worden met het feit dat bij een flinke toename van de uitgangsvirustiter de selectiviteit mogelijk afneemt via het optreden van non-specifieke receptorbinding.

4.2.5 Combinatie van therapieën

Bij risico analyses dienen ook eventuele combinatie van therapieën worden meegenomen, aangezien deze direct of indirect effect kunnen hebben op het gedrag van vectoren.

Er zijn diverse studies uitgevoerd waar virotherapie gecombineerd wordt met andere antikankermiddelen. Dit kan de effectiviteit van conditioneel replicerende (adeno)virussen beïnvloeden. Adenovirusbinding is optimaal tijdens M fase van de celcyclus. Paclitaxel stabiliseert microtubuli die de celcyclus in de M fase houden en verhoogt adenovirusbinding en genexpressie. Middelen als paclitaxel, vinblastine en vincristine kunnen mogelijk zorgen voor een verhoogde effectiviteit in combinatie met adenovirustherapie. Hiernaast kan effectiviteit verhoogd worden door straling, waarbij een mogelijke verklaring zou zijn dat de tumorstructuur, die bestaat uit een heterogene groep cellen, wordt verstoord, waardoor virussen weer eenvoudiger andere kankercellen kunnen bereiken. En eerder is al immuunsuppressie van de gastheer genoemd om de persistentie en effectiviteit van virale vectoren te verhogen.

4.2.6 Shedding en kiembaantransductie

Het optreden van shedding wordt vooralsnog beschouwd als beperkt en beheersbaar. Gezien de nog beperkte gegevens en de ontwikkeling van nieuwe vectoren is verdere dataverzameling noodzakelijk om tot een goede risico analyse te kunnen komen.

Wanneer gekeken wordt naar risico's voor het milieu dient speciale aandacht uit te gaan naar het mogelijk optreden van shedding en kiembaantransductie. Over dit onderwerp heeft de COGEM in januari 2004 een workshop gehouden. Vooralsnog wordt het risico op shedding als beheersbaar beschouwd. Tot op heden zijn er twee klinische studies gemeld waarbij vectorsequenties in het sperma aangetoond waren [Biological Response Modifiers Advisory Committee, FDA, May 10, 2002]. De eerste melding betrof een studie van Chiron

Corporation, waarbij een retrovirale vector met factor VIII gen intraveneus was toegediend aan patiënten met hemofilia A. Negen weken na toediening was een spermamonster positief, monsters op volgende tijdstippen waren alle negatief. Een tweede melding betrof een studie van Avigen Inc., waarbij een adeno-geassocieerde virale vector met factor XI gen via de leverader was toegediend bij patiënten met hemofilia B. Bij de eerste twee behandelde patiënten was de analyse van sperma positief voor de vector. Bij de eerste patiënt werden na 10 weken geen positieve monsters meer gevonden. Van de tweede patiënt zijn alleen vroege tijdstippen bekend. De FDA heeft deze studie tijdelijk stopgezet, maar de studie mocht na evaluatie weer voortgezet worden. Met de ontwikkeling van nieuwe vectoren, met name de replicatie-competente virussen en virussen met een breed gastheerbereik, kunnen de risico's op shedding en kiembaantransductie verhoogd worden en zal (verhoogde) aandacht gewenst zijn.

4.2.7 Diermodellen

Het verder ontwikkelen van proefdiermodellen is essentieel voor goede risico analyses.

Verbeterde technieken maken het mogelijk om virusaanwezigheid en expressie in vivo (zowel in proefdieren als patiënten) te monitoren en hiermee betere risicoinschattingen te maken.

Aanvankelijk is het risico op insertiemutagenese als hypothetisch beschouwd, maar door verdere verbetering in diermodellen door toepassing van langere observatietijden en systemen van retransplantatie (waardoor het hemopoietische systeem onder druk wordt gezet) kan het oncogene risico beter ingeschat worden.

Het ontbreken van een geschikt immunocompetent model voor replicatie-competente adenovirussen is een beperkende factor voor een goede risico analyse. Ook voor de evaluatie van RNA virussen voldoen proefdiermodellen lang niet altijd [Russell, 2002]. Voor het herpes simplexvirus zijn er wel relevante diermodellen (BALB/c of A/J muizen en het Nieuwe Wereld uilaapje, *Aotus nancymae*) beschikbaar, die het gevoeligheidspatroon van mensen voor HSV1 goed nabootsen. Echter, risico analyses voor nieuwere vectoren zullen lastiger worden. Er dient rekening gehouden te worden met meer virulente fenotypen, nieuwe of tot nu toe niet onderkende toxiciteit door veranderd tropisme of transgenexpressie, door multipale dosis geïnduceerde immunoresponsen. Immunostimulatoire virussen die specifieke cytokinen (zoals IL-12, GM-CSF, et cetera) tot expressie brengen kunnen de immunoregulatorische balans in de gastheer veranderen. Daarom zouden toxicologische evaluaties in meerdere (muizen) stammen uitgevoerd dienen te worden. Het zal voor zich

spreken dat een verstoord immuunsysteem en een verhoogde virulentie niet alleen gevolgen kan hebben voor de patiënt zelf, maar ook voor zijn omgeving.

Om een beter inzicht te krijgen in de virusaanwezigheid en genexpressie in levende dieren komen er steeds meer technieken ter beschikking, zoals magnetic resonance imaging (MRI) en positron emissie tomografie (PET) [Hospers *et al*, 2000, Min & Gambhir, 2004]. Goede monitoring van patiënten behandeld met nieuwe conditioneel replicerende virussen zal belangrijk zijn. Zeker het monitoren van virusshedding is een belangrijk punt van veiligheid voor patiënt en milieu.

In aanvulling op bestaande proefdiermodellen worden ook humane weefselculturen ('slices') steeds verder geoptimaliseerd, waardoor er een weefselorganisatie kan ontstaan die grote gelijkenissen vertoont met de *in situ* conditie [Gähwiler *et al.*, 1997]. Vanzelfsprekend zijn dit welkome aanvullingen op de bestaande proefdiermodellen.

4.2.8 Risico's bestaand naast gebruikte technologie

Deskundigheid en alertheid personeel

Bij het steeds breder beschikbaar komen van genterapietechnieken blijft het belangrijk dat alle betrokkenen (laboratorium- en ziekenhuispersoneel) goed getraind zijn in de omgang met de uiteenlopende materialen. Van vacciniavirus zijn verschillende meldingen bekend over laboratoriumpersoneel dat (onopzettelijk) een vacciniavirusinfectie heeft opgelopen [ACGM, 2003]. Ofschoon de betrokken personen getraind waren in laboratoriumtechnieken en bekend waren met de risico's van werken met vacciniavirus bleken verschillende mensen niet bekend met de symptomen van een vacciniaïnfectie en realiseerden zich daardoor in eerste instantie niet dat zij waren geïnfecteerd. Ook waren zij zich niet altijd bewust van een per ongeluk opgetreden inoculatie of morsen van het virus. Dit geeft aan dat de mogelijkheid bestaat dat infecties met recombinante virale vectoren niet worden opgemerkt. De vraag hoe ernstig dit is, hangt uiteraard samen met het type vector dat gebruikt wordt, alsook met de gezondheid van de betrokken persoon. In ieder geval gaat het altijd om een ongewenste introductie in het milieu. Om de eventuele gevolgen zoveel mogelijk te beperken is het derhalve niet alleen belangrijk om goed getraind personeel te hebben, maar ook dienen zij zich bewust te zijn van signalen die wijzen op een infectie zoals die veroorzaakt kan worden door het betreffende virus waar zij mee werken. Voor vaccinia staat dit bijvoorbeeld op de website van 'Vaccinia (Smallpox) Vaccine Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2001' (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5010a1.htm>).

Rol van de patiënt

Patiënten die voor een bepaalde ziekte behandeld worden hebben dat ziektebeeld met elkaar gemeen, maar vertonen daarnaast veel verschillen. Die verschillen kunnen van invloed zijn op de (gen)therapie. Mogelijke risicoverhogende factoren zijn al op verschillende plaatsen in dit hoofdstuk en in hoofdstuk 2 gemeld zoals de rol van de genetische achtergrond, immunocompetentie en mogelijk ook de leeftijd van de betrokken patiënt. En deze lijst van factoren zal in de toekomst wellicht verder uitgebreid worden. Toch wordt de patiënt hier apart genoemd, omdat de verwachting is dat zijn/haar rol belangrijker zal worden bij toekomstige risico analyses. Afgezien van mogelijk virulenter gedrag van de gebruikte virale vector, worden hiervoor geen speciale risico's voor het milieu verwacht.

4.2.9 Slotopmerkingen

Zoals in de introductie van dit hoofdstuk al werd opgemerkt dient er in de praktijk bij risicoafwegingen altijd een soort balans te worden gevonden tussen potentieel nut van een nieuwe therapie en potentieel risico. Hierover schreef Malcolm Brenner een editorial, waarbij hij waarschuwde voor mogelijke gevaar van overregulatie door het verwarren van 'risk perception' en daadwerkelijke 'risk evidence'. Dit betekent overigens ook dat een risico analyse geen statisch gegeven is, maar bepaald wordt door de kennis van dat moment.

5 Aandachtspunten

Op het gebied van de genterapie is er aantal onderwerpen dat speciale aandacht verdient met betrekking tot de aspecten van risico voor mens en milieu. Deze onderwerpen zijn uitgebreider besproken in de hoofdstukken over Nieuwe ontwikkelingen en de Globale risico analyse. Hier wordt deze informatie samengevat en onderverdeeld in aandachtspunten (zie ook *Tabel 7*). Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen enerzijds factoren die raken aan het risico voor mens en milieu, en anderzijds de overige aandachtspunten. Verder wordt kort ingegaan op (praktische) zaken die betrekking hebben op de Nederlandse situatie.

5.1 Factoren direct relevant voor risico voor mens en milieu

(Genetische) modificatie van het tropisme van virale vectoren

> Het gebruik van vectoren waarvan het tropisme veranderd is door (genetische) modificatie van de vector is de laatste jaren sterk toegenomen. Hiermee wordt getracht om onder andere de specificiteit van genafgifte te verhogen. Bij het maken van risico analyses is het niet altijd (meer) mogelijk om zich te baseren op de bestaande kennis van en inzicht in de eigenschappen van het uitgangsvirus.

> Het is zinvol om de ontwikkelingen en mogelijke consequenties op het gebied van modificatie van het vectortropisme verder in kaart te brengen. Speciale aandacht hierbij verdienen vectoren waarbij de modificatie van het tropisme in het virale genoom verankerd ligt en het mogelijke risico van optreden van recombinitie met wild type virussen.

Voor modificatie of uitbreiding van het tropisme zijn veel verschillende varianten mogelijk. Enkele voorbeelden zijn het gebruik maken van verschillende serotypen of varianten, het gebruik van chimaere vectoren samengesteld uit delen van verschillende virussen, en het toevoegen van liganden in het virus capside waardoor andere receptoren worden gebruikt voor binding aan de cellen, bijvoorbeeld het incorporeren van het RGD motief (arginine-glycine-asparaginezuur) in de fiber van het adenovirus. Het tropisme van een virale vector kan zodanig worden gemodificeerd dat celtropisme en/of de gastheerspecificiteit gewijzigd is ten opzichte van het oorspronkelijke virus. Dit heeft directe relevantie voor de risico analyse. Hoe groot of relevant de impact is van dergelijke modificaties hangt van diverse factoren. Wat is de pathogeniciteit van het uitgangsvirus? Zijn er effectieve antivirale agentia beschikbaar?

Hoe groot is de kans dat er een recombinatie optreedt tussen de gemodificeerde vector en een homologe replicatie competent wild-type virus in de populatie? En wat zouden de consequenties zijn wanneer de tropisme veranderende modificatie zou worden overgedragen op een wild-type virus?

Selectieve replicatie van virale vectoren

> *Om kanker effectiever te behandelen worden selectief replicerende virale vectoren ontwikkeld. Het verhogen van de efficiëntie van deze vectoren om selectief in kankercellen te kunnen vermenigvuldigen is zowel bepalend voor de kans op succes als voor het risico op bijwerkingen. Het gebruik van deze vectoren kan leiden tot verhoogd optreden van shedding.*

> *Het is raadzaam de verschillende strategieën van selectieve replicatie van virale vectoren te analyseren en nauwlettend te volgen, alsook te testen in (dier)modelsystemen zodat het optreden van shedding en andere effecten bepaald kunnen worden.*

Selectieve virusreplicatie is gebaseerd op tumorbiologie en/of virale vectoraspecten, al dan niet gemodificeerd of van 'nature' aanwezig. Het lastige van een risicobepaling bij selectief replicerende vectoren is, dat de vector hoeveelheden toenemen. Daarmee neemt niet alleen de potentiële toxiciteit toe, maar ook de kans dat de vector wordt uitgescheiden door de patiënt en terecht komt in het milieu. Bovendien zal de shedding ook in de tijd kunnen variëren. Het risico is mede afhankelijk van het type virus dat gebruikt wordt. Hier gelden vergelijkbare vragen als bij virale vectoren waarbij het tropisme is uitgebreid. Verder kan de kanttekening geplaatst worden dat proefdiermodellen zeker voor dit soort type virale vectoren duidelijk hun beperkingen hebben en werkelijke risico's voor mens en milieu uiteindelijk pas realistisch ingeschat kunnen worden met klinische (pilot)studies.

Op dit moment is er overigens nog geen specifieke regelgeving voor het produceren en testen van replicatiecompetente oncolytische virussen. Wel is er een eerste aanzet gegeven in een artikel door Wisner [2002].

Ontsnapping aan het immuunsysteem

> *Virale vectoren kunnen langer effectief zijn indien zij kunnen persisteren in de patiënt. Aanvankelijk werd dit bereikt door systemische immuunsuppressie. Nieuwe vectortechnologieën maken het mogelijk om meer specifiek de immuunrespons tegen het virus te beperken waardoor de vector minder zichtbaar wordt voor het immuunsysteem.*

Door de reductie van de immunogeniteit van de vectoren zullen deze langer persisteren.

Verbetering van de effectiviteit van dergelijke vectoren in combinatie met selectief replicerende vermogens kan mogelijk het risico op shedding vergroten.

> Het verdient aanbeveling deze ontwikkelingen nauwlettend te volgen, zodat de mogelijke risico's voor mens en milieu bepaald kunnen worden.

Om virale vectoren te laten ontsnappen aan het immuunsysteem van de gastheer en daardoor effectiever te maken zijn verschillende strategieën mogelijk. Vectoren kunnen voorzien worden van groeifactoren om zo het immuunsysteem te beïnvloeden. Een andere manier is om vectoren zo aan te passen dat ze door het immuunsysteem niet meer gesignaleerd worden. Dit is gedaan door uit vectoren zoveel mogelijk voor eiwit-coderende sequenties te deleteren (bijvoorbeeld de 'gutless' adenovirus vectoren). Een meer recente variant is het gebruik van sequenties die zorgen voor een afscherming van het immuunsysteem ('stealth' vectoren). Door gebruik van dit type vectoren wordt het de gastheer moeilijker gemaakt de vectoren op te ruimen. Ofschoon dit een verbetering is ten opzichte van eerdere strategieën waarbij een meer algemene immuunsuppressie werd toegepast, betekent dit wel dat vectoren in principe langer kunnen persisteren. Zeker in combinatie met selectief replicerende vectoren kan de kans op shedding toenemen. Bij dergelijke vectoren zal het belangrijk zijn om na te gaan wat de gevolgen kunnen zijn voor zowel de patiënt als het milieu.

Combinatie van therapieën

> Na de eerste demonstratie van het genterapie concept en het bepalen van de veiligheid van genterapievectoren is een volgende stap het verbeteren van de effectiviteit van genterapie. Een van de opties is om genterapie te combineren met andere therapieën. Het is belangrijk om te realiseren dat risico's van genterapie niet alleen worden bepaald door de betreffende vector, maar ook door de context waarin deze gebruikt wordt. Door bijvoorbeeld chemotherapie of radiotherapie kan het gedrag van virale vectoren beïnvloed worden. Verder is de immuun status van de patiënt van invloed op de persistentie van virale vectoren.

> Bij risicoafwegingen dienen ook de effecten van het combineren van therapieën meegenomen te worden, aangezien zij het gedrag van virale vectoren kunnen beïnvloeden.

Wanneer genterapie niet de enige behandeling is, maar gecombineerd wordt met bijvoorbeeld chemotherapie of radiotherapie, dienen nieuwe risico analyses gemaakt te worden. Door gebruik van een ondersteunende therapie bij virotherapie kunnen gebruikte virale vectoren virulenter worden dan wanneer ze alleen toegepast worden. Dit kan ook optreden wanneer het immuunsysteem van de patiënt wordt gecompromitteerd.

Shedding

> De gevolgen van de introductie van genterapievectoren in het milieu door het optreden van shedding vanuit de patiënt zijn vooralsnog beperkt en worden aanvaardbaar geacht.

Feitelijke gegevens over de mate van optreden van vector shedding zijn slechts in beperkte mate openbaar en zijn in het verleden niet altijd systematisch geanalyseerd.

> Het verdient aanbeveling om sheddingdata centraal en toegankelijk op te slaan om zo betere risico analyses mogelijk te maken.

Een thema dat direct betrekking heeft op mogelijk gevaar voor mens en milieu is de zogenoemde ‘shedding’. De bekende resultaten, zoals beschreven in de literatuur en gepresenteerd tijdens de recent gehouden COGEM-workshop, laten zien het optreden van shedding beperkt is en beheerst kan worden. De komst van nieuwe (bijvoorbeeld selectief-replicerende) vectoren houdt dit thema actueel en belangrijk.

Kiembaantransmissie

> Tot op heden zijn er twee klinische studies gemeld waarbij vectorsequenties in het sperma op vroege tijdstippen na genterapie aangetoond waren.

> Met de ontwikkeling van nieuwe genterapievectoren zal kiembaantransmissie een belangrijk onderwerp blijven.

5.2 Overige risicofactoren

Insertiemutagenese

> Het risico op insertiemutagenese is niet meer een slechts hypothetisch risico. Er bestaat een reëel, zij het klein, risico op consequenties voor de veiligheid van de patiënt. Bovendien is er een trend waarbij van oorsprong niet integrerende vectoren voorzien worden van integrerende eigenschappen. Reden hiervoor is het voordeel van integrerende vectoren, op deze manier blijft het transgen immers aanwezig in de getransduceerde cellen en de dochtercellen.

> Mogelijkheden om het risico op insertiemutagenese en in de toekomst te beperken zijn helderder geworden. Tegelijkertijd worden er nieuwe vectoren ontwikkeld met nieuw integrerende eigenschappen, derhalve verdient het aanbeveling om verdere ontwikkelingen op het gebied van vectorintegratie goed te volgen.

Het risico van insertiemutagenese was allang bekend, maar de laatste jaren is dit onderwerp actueler geworden door het optreden van leukemie bij twee kinderen die een experimentele

gentherapie behandeling hebben ondergaan. Hoewel dit risico met name evident is bij het gebruik van retrovirale vectoren is ook bij andere DNA vectoren dit risico aanwezig. Wel verschillen de risico's per vector. Het is daarom moeilijk om harde uitspraken te doen over het de feitelijke kans op vector-geïnduceerde oncogene transformatie en het optreden van kanker na gentherapie. Hierover zijn nog zeer weinig gegevens beschikbaar, maar de resultaten uit experimenten in proefdieren wijzen op een zeer kleine kans. Naast dit potentiële risico biedt integratie in het genoom ook stabielere transgenexpressie. Daarom wordt gewerkt aan het verbeteren vectoren en minimaliseren risico's, bijvoorbeeld door het beperken van de invloed van de promotor buiten de expressiecassette door het toepassen gebruik van zogenoemde 'insulators', en plaats specifieke integratie.

Transgen

> Bij het steeds veiliger maken van gentherapievectoren (onder andere door het verbeteren van productiemethoden) komt de rol en de veiligheidsaspecten van het gebruikte transgen meer naar voren.

> Zoals voor elk medicijn bestaat er bij gentherapievectoren een optimale dosis. Het risico van overdosering is reëel aanwezig. Mogelijke bijwerkingen van het tot expressie gebrachte eiwit door het transgen is niet noodzakelijkerwijs inherent aan de gentherapieprocedure zelf. Binnen de virotherapie was er al aandacht voor toxiciteit van transgen in normaal weefsel versus kankercellen, maar dit begint nu ook buiten de kankergentherapie meer actueel te worden. Een aantal klinische studies binnen de neurologie laat bijwerkingen zien die toe te schrijven zijn aan expressie van transgen zelf en lijken los te staan van de gebruikte gentherapievector. Ook het ontstaan van leukemie bij twee X-SCID patiënten lijkt mede gerelateerd te zijn aan het gebruikte transgen. De verwachting is dat men in de toekomst vaker geconfronteerd zal worden met dergelijke effecten. Deze zullen beter te anticiperen zijn wanneer meer inzicht ontstaat in relevante werkingsmechanismen. Nauwkeurige regulatie van expressie kan de problemen voorkomen. Het is evident dat eventuele bijwerkingen gerelateerd aan transgenexpressie relevant zijn voor de behandelde patiënt, maar minder voor implicaties heeft voor mens en milieu.

Achtergrond patiënt

> De conditie en (genetische) constitutie van de patiënt spelen een rol bij de effectiviteit van een therapie. Dit geldt ook voor gentherapie.

> Op de korte termijn ontbreekt de kennis om hiermee rekening te houden bij het uitvoeren van klinische genterapiestudies. Op de langere termijn zal inzicht in de (genetische) constitutie van de patiënt leiden tot effectievere en veiligere therapieën.

Uit muizenstudies is gebleken, dat de genetische achtergrond een belangrijke invloed kan hebben op de effectiviteit van genterapie. De X-SCID studie suggereert een verband met gevonden effecten en de (zeer jonge) leeftijd waarop de leukemiepatiënten destijds genterapie ondergingen. Bij recente klinische studies van kankerpatiënten wordt duidelijk dat er onderscheid gemaakt kan worden tussen subpopulaties van patiënten, waarbij de therapie beter, minder goed of zelfs niet aanslaat. Dergelijke ontwikkelingen zullen op de langere termijn ook bij genterapie relevant worden, waarmee uiteindelijk de therapie effectiever en veiliger kan worden.

5.3 Ondersteuning voor risico analyse

Diermodellen

> Ondanks het evalueren van de te gebruiken strategie in diermodellen, waren de opgetreden incidenten (overlijden van een patiënt na toediening van een adenovirale vector en het optreden van leukemie bij twee patiënten ten gevolge van retrovirale insertiemutagenese) niet voorzien. Diermodellen hebben hun beperkingen.

> Het verder ontwikkelen en optimaliseren van relevante diermodellen is onverminderd belangrijk voor het testen van effectiviteit en het bepalen van mogelijke risico's die nieuwe therapieën met zich mee kunnen brengen.

Mede op basis van ervaringen uit klinische toepassing van genterapie worden proefdiermodellen verder ontwikkeld. Hierdoor zal ook het risico op insertiemutagenese in de toekomst realistisch in te schatten zijn. In de praktijk blijkt het nog steeds lastig om proefdiermodellen te ontwikkelen die een goede voorspelling bieden voor de respons bij mensen. Bij replicerende vectoren speelt dit nog sterker. Door verschillen in replicerend vermogen van virale vectoren en verschillen in het immuunsysteem in diverse gastheren (muis, rat, aap, mens) is het lastig om tot een goede risico analyse te komen. Men zal dan ook altijd bereid moeten zijn om een bepaald risico's bij de start van nieuwe klinische protocollen te accepteren.

Databanken

> Goede risico analyses zijn alleen mogelijk indien relevante data algemeen toegankelijk zijn. Daarom is het opzetten en verder ontwikkelen van databanken (zoals gegevens over

effectiviteit en bijwerkingen, virale insertieplaatsen en shedding) onmisbaar voor enerzijds verdere ontwikkeling van genterapie als klinisch toepasbare entiteit, en anderzijds voor (virale) genoverdracht vectoren als technologieplatform. Praktische kanttekeningen hierbij betreffen de diversiteit van virale vectorontwerpen en productiemethoden, dit zal de vergelijking van grote datasets bemoeilijken.

> De overheid kan een belangrijke rol spelen in het verzamelen en het centraal beschikbaar stellen. Het verdient aanbeveling op internationaal niveau een actief beleid te voeren om methoden te standaardiseren, verschillende data te verzamelen en algemeen beschikbaar te stellen.

Het ontwikkelen van nieuwe therapieën is een iteratief proces, waarbij telkens geleerd wordt van nieuw behaalde resultaten, waarop behandelmethoden kunnen worden bijgesteld. Dit is alleen goed mogelijk indien gevonden resultaten toegankelijk en goed analyseerbaar zijn. Om genterapie veiliger te maken is het gebruik van beschikbare kennis over effectiviteit en veiligheid essentieel. Hiervoor zijn (internationale) databanken onontbeerlijk. Praktische kanttekening hierbij is dat er heden ten dage grote verschillen bestaan in vectorontwerp alsook productie (zuiverheid vectorbatch en yield). Dit maakt het moeilijk om datasets met elkaar te vergelijken. Standaardisatie van vectorproductie door overheidsinstanties zoals de FDA, alsook de farmaceutische industrie is van wezenlijk belang. Naast databanken met resultaten en bijwerkingen van patiëntenstudies, zijn bijvoorbeeld ook databanken met gegevens over insertieplaats en mogelijke effecten (zowel van patiënten, als proefdieren) van belang om insertiemutagenese verder te kunnen analyseren. In de toekomst zullen er steeds meer (genetische) databanken opgezet worden wat uiteindelijk zal leiden tot een effectiever gebruik van therapieën alsook steeds meer gericht worden op de individuele patiënt.

5.4 Aandachtspunten Nederland

(Internationale) toegankelijkheid data genterapiestudies

> Informatie over Nederlandse klinische genterapieprotocollen (34 in totaal, eind 2003) is vooralsnog alleen te extraheren van de VROM website, terwijl meerdere organisaties relevante informatie toegankelijk zouden kunnen maken. Op dit moment is informatie over lopende genterapiestudies, verantwoordelijke onderzoekers, aantallen deelnemende patiënten moeilijk te achterhalen.

> De uitwisseling van informatie met het buitenland dient gestimuleerd te worden. Dat kan enerzijds door meer informatie in het Engels aan te bieden (zodat Nederland duidelijker op de genterapeutische wereldkaart geplaatst wordt), anderzijds door verdere Europese

harmonisatie van regelgeving van klinische genterapiestudies (waardoor internationale samenwerking vergemakkelijkt wordt).

Op dit moment heeft alleen het ministerie van VROM een overzicht van aanvragen voor ‘introductie in het milieu’ ten behoeve van klinische genterapieprotocollen op haar website staan. Dit zou breder toegankelijk en met aanvullende relevante informatie kunnen worden uitgebreid door meerdere betrokken partijen zoals de CCMO en bureau GGO. Verder zou de beschikbaarheid van een Engelse versie de zichtbaarheid van de expertise van Nederland in het buitenland aanzienlijk kunnen vergroten. Opname van de klinische genterapiestudies in de veel geciteerde Wiley database zou Nederland duidelijker op de genterapeutische wereldkaart plaatsen. Er zijn via de VROM website 34 aanvragen introductie in het milieu gevonden met het trefwoord genterapie, terwijl er slechts 6 klinische genterapiestudies vermeld staan op de Wiley site.

In Nederland worden diverse initiatieven ontplooid om het klimaat voor het bespreken van mogelijke knelpunten te bevorderen. Dit betreffen verbeterde begeleiding rondom indiening genterapieprotocollen bij regulerende instanties en organisatie van workshops om discussie rondom (veiligheids)thema’s, zoals shedding, te stimuleren. Het is wenselijk dat deze trend voor het breder en internationaal toegankelijk maken van bestaande kennis zich verder voortzet.

Hiernaast verdient het aanbeveling om steeds meer te werken richting Europese harmonisatie van regelgeving omtrent klinische genterapie. In de praktijk blijken studies veelal internationale samenwerkingen te betreffen. Verdere harmonisatie zou het participeren van Nederlandse instituten in dergelijke multinationale trials kunnen stimuleren.

Financiering

> De ontwikkeling van genterapie voor veel toepassingen zal nadrukkelijk afhankelijk zijn van academisch onderzoek. ZonMw heeft in het programma Translationeel Genterapeutisch Onderzoek tot 2013 in totaal 15,8 miljoen euro beschikbaar voor translationele genterapiestudies. Dit geeft aan dat de verdere ontwikkeling van klinische genterapiestudies in Nederland gestimuleerd wordt.

> Experimentele genterapie is relatief duur. De productiekosten van virale vectorbatches zijn hoog, alleen met toenemende patiëntenaantallen zullen de kosten per patiënt significant kunnen afnemen. Op de lange termijn kan genterapie wel kostenbesparend zijn bij bijvoorbeeld enzymvervangingstherapieën. Dit geldt vanzelfsprekend op voorwaarde dat eerst is laten zien dat genterapie een veilig alternatief is voor de huidige therapie.

De internationale trend dat de grote farmaceutische industrie uit genterapie stapt, maar dat kleinere biotech bedrijven vooralsnog actief blijven (of worden) doet zich ook in Nederland voor. Voor veel zeldzame ziekten wordt de ontwikkeling van genterapieontwikkeling gedragen door academische onderzoeksgroepen. De Nederlandse onderzoeksgroepen hebben een goede naam. De toekomstige positie van Nederland binnen het internationale genterapieveld zal mede bepaald worden door de financieringsmogelijkheden. ZonMw voert in opdracht van VWS het programma Translationeel Genterapeutisch Onderzoek uit. Dit is een positief signaal vanuit de politiek. Echter, bij onderzoekers leeft de zorg over gebrek aan structurele financiering voor genterapie en ook de subsidiemogelijkheden om meer basaal onderzoek op dit gebied te verrichten zijn zeer beperkt. Voor de middellange termijn kan de (beperkte) financiering gevolgen hebben op de ontwikkeling van Nederlands genterapieonderzoek.

Financiële ondersteuning vanuit Brussel voor het oprichten van Europese netwerken zou enorm kunnen bijdragen aan standaardisatie van vectorontwerp en productie, klinische studieopzet en informatieuitwisseling tussen Europese landen. Dit in analogie met IAVI (International Aids Vaccin Initiative) of MVI (Malaria Vaccinia Initiative).

5.5 Overzichtstabel met besproken thema's

Tabel 7. Thema's op het gebied van de gentherapie die speciale aandacht verdienen met betrekking tot de aspecten van risico voor mens en milieu.

Risicofactoren relevant voor mens en milieu

- Modificatie tropisme virale vectoren
(chimaere vectoren, insertie 'protein transduction domain' / PTD, insertie arginine-glycine-asparaginezuur / RGD motief)
- Selectieve replicatie van virale vectoren
(gebaseerd op tumorbiologie en/of virale vectoraspecten, al dan niet gemodificeerd of van 'nature' aanwezig)
- Ontsnapping aan immuunsysteem
(insertie groeifactoren, 'leeggeloopte' vectoren, insertie 'stealth' genen)
- Combinatietherapie
(andere vectoren, chemotherapie, radiotherapie)
 - > risico op recombinatie met wild-type virus
 - > verhoging kans optreden van 'shedding'
 - > verhoging kans op kiembaantransductie

Overige risicofactoren

- Insertiemutagenese
- Toxiciteit van transgen
- (Genetische) achtergrond patiënt

Ondersteuning voor risico analyse

- Verdere ontwikkeling relevante diermodellen
(voor betere voorspelling virale vectorgedrag *in vivo*, betere inschatting voor toepassing bij specifiek ziektebeeld)
- Opzetten en uitbreiden databanken
(virale insertieplaatsen, (shedding)data uit klinische studies, genetische data)

Aandachtspunten Nederland

- Nederlandse gentherapie zaken meer (internationaal) toegankelijk maken
(klinische gentherapie data breder beschikbaar, alsook in Engelse versie aanbieden, meer richten op Europese harmonisatie van regelgeving)
- Financierings(on)mogelijkheden van Nederlands gentherapie onderzoek

Opmerkingen bij de verschillende thema's genoemd in Tabel 7:

Risicofactoren relevant voor mens en milieu

De hierbij genoemde thema's zullen in nieuwe vergunningsaanvragen terugkomen. Om goed op nieuwe ontwikkelingen te kunnen anticiperen dienen deze thema's nauwlettend gevolgd te worden.

Overige risicofactoren

De genoemde thema's zijn met name van belang bij beoordeling veiligheid van de patiënt. Een uitzondering zou zijn in het geval dat een virale vector geïntroduceerd wordt in een andere persoon dan een patiënt.

Ondersteuning voor risico analyse

De genoemde onderwerpen zijn van groot belang voor het onderbouwen van toekomstige risico analyses. Het zou raadzaam zijn om de ontwikkeling van dergelijke hulpmiddelen verder te stimuleren. Vanzelfsprekend zullen de uiteindelijke resultaten van dergelijke ondersteuning ten goede komen van eigenlijk alle betrokken partijen bij gentherapie. Van onderzoeker tot patiënt en van vergunningsverlenende instantie tot commercieel bedrijf.

Aandachtspunten Nederland

De genoemde onderwerpen zijn met name van belang om gentherapieonderzoek in Nederland te faciliteren. Bovendien kan door stimulering van genoemde onderwerpen Nederland zich in het gentherapieveld duidelijker profileren naar de rest van de wereld.

Bijlagen

Lijst geïnterviewden

Prof. C. Bangma, uroloog

Erasmus MC, Rotterdam

Afdeling Urologie

Dr. J. Boesen, CEO

AMT B.V., Amsterdam

Dr. E. Braakman, immunoloog

Erasmus MC, Rotterdam

Afdeling Hematologie

Prof. dr. H.J. Haisma, medisch bioloog

Rijksuniversiteit Groningen, Groningen

Therapeutische Genmodulatie

Dr. M. Havenga, vice-president research

Crucell, Leiden

Prof. dr. J. Verhaagen, neurobioloog

Nederlands Instituut voor Hersenonderzoek, Amsterdam

Afdeling Neuroregeneratie

Dr. A.R. Wafelman, apotheker

Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden

Afdeling Klinische farmacie en toxicologie

Dr. G. Wagemaker, hematoloog

Erasmus MC, Rotterdam

Afdeling Hematologie

Referenties

- ACGM, Advisory Committee on Genetic Modification (2003). Accidental infection with vaccinia virus. Newsletter 32, paper 8.
- Arteaga CL (2004). Selecting the right patient for tumor therapy. *Nature Med* **10**: 577-8.
- Auricchio A, O'Connor E, Weiner D, Gao G-P, Hildinger M, Wang L, Calcedo R, Wilson JM (2002). Noninvasive gene transfer to the lung for systemic delivery of therapeutic proteins. *J Clin Invest* **110**: 499-504.
- Baum C, Düllmann J, Li Z, Fehse B, Meyer J, Williams DA, von Kalle C (2003). Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* **101**: 2099-114.
- Berns A (2004). Good news for gene therapy. *N Engl J Med* **350**: 1679-80.
- Beusechem VW van, Mastenbroek DCJ, Doel PB van den, Lamfers MLM, Grill J, Würdinger, Haisma HJ, Pinedo HM, Gerritsen WR (2003). Conditionally replicative adenovirus expressing a targeting adapter molecule exhibits enhanced oncolytic potency on CAR-deficient tumors. *Gene Ther* **10**: 1982-91.
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* **270**: 475-80.
- Brenner M (2002). Evidence-based regulation – a personal view. *Mol Ther* **6**: 137.
- Büning H, Ried MU, Perabo L, Gerner FM, Huttner NA, Enssle J, Hallek M (2003). Receptor targeting of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* **10**: 1142-51.
- Capecchi MR (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**: 1288-92.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C., Certain S, Casanova JL, Bouso P, Deist FL, Fisher A (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**: 669-72.
- Cavazzana-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F (2004). The future of gene therapy. Balancing the risks and benefits of clinical studies. *Nature* **427**: 779-81.
- Cheng SH, Smith AE (2003) Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders. *Gene Ther* **16**: 1275-81.
- Connolly JB (2002). Lentiviruses in gene therapy clinical research. *Gene Ther* **9**: 1730-4.
- Connolly JB (2003). Conditionally replicating viruses in cancer therapy. *Gene Ther* **10**: 712-5.
- Davé UP, Jenkins NA, Copeland NG (2004). Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science* **303**: 333.
- Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, McDonagh K, Dunbar C, Goodman S, Agriala B, Byrne E, Raffeld M, Moen R, *et al.* (1992). Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* **176**: 1125-35.
- Dumon JC, Sneyers M, Moens W (2000). Verslag: eerste gerapporteerde sterfgeval ten gevolge van genterapie. Verkregen van het internet: <http://biosafety.ihe.be>
- George St JA (2003). Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther* **10**: 1135-41.
- Giannoukakis N, Trucco M (2004). The nemesis of autoimmunity. *Gene Ther* **11**: 231-2.
- Goncalves MA, van der Velde I, Knaan-Shanzer S, Valerio D, de Vries AA (2004). Stable transduction of large DNA by high-capacity adeno-associated virus/adenovirus hybrid vectors. *Virology* **321**:287-96.

- Graham FL, van der Eb AJ (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* **54**: 536-9.
- Griesenbach U, Cassady RL, Ferrari S, Fukumura M, Müller C, Schmitt E, Zhu J, Jeffery PK, Nagai Y, Geddes DM, Hasegawa M, Alton EFW (2002). The nasal epithelium as a factory for systemic protein delivery. *Mol Ther* **5**: 98-103.
- Hacein-Bey-Abina, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulfraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leive L, Cavazzana-Calvo M (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* **346**: 1185-93.
- Ebeling SB, Simonetti ER, Borst HP, Blok A, Schelen AM, Braakman E, Ederveen J, Hagenbeek A (2003). Human primary T lymphocytes have a low capacity to amplify MLV-based amphotropic RCR and the virions produced are largely noninfectious. *Gene Ther* **10**:1800-6.
- Engelhardt JF (2002). The lung as a metabolic factory for gene therapy. *J Clin Invest* **110**: 429-32.
- Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM (1997). Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci* **20**: 471-7.
- Haisma HJ (2004). Genetische doping. Nederlands Centrum voor Dopingsvraagstukken.
- Hart SL, Knight AM, Harbottle RP, Mistry A, Hunger HD, Cutler DF, Williamson R, Coutelle C (2004). Cell binding and internalization by filamentous phage displaying a cyclic Arg-Gly-Asp-containing peptide. *J Biol Chem* **269**:12468-74
- Harui A, Suzuki S, Kochanek S, Mitani K (1999). Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J Virol* **73**: 6141-6.
- Haviv YS, Blackwell JL, Kanerva A, Nagi P, Krasnykh V, Dmitriev I, Wang M, Naito S, Cei X, Hemmink CA, Cavey D, Curiel DT (2002). Adenoviral gene therapy for renal cancer requires retargeting to alternative cellular receptors. *Cancer Res* **62**: 4273-81.
- Hermiston T (2000). Gene delivery from replication-selective viruses: arming guided missiles in the war against cancer. *J Clin Invest* **105**: 1169-72.
- Herweijer H, Wolff JA (2003). Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* **10**: 453-8.
- Hospers GA, Calogero A, van Waarde A, Doze P, Vaalburg W, Mulder NH, de Vries EF (2000). Monitoring of herpes simplex virus thymidine kinase enzyme activity using positron emission tomography. *Cancer Res* **60**: 1488-91.
- Jackson RJ, Ramsay AJ, Christensen CD, Beaton S, Hall DF, Ramshaw IA (2001). Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. *J Virol* **75**: 1205-10.
- Jacoby J (2004). Gene therapy: cornerstone of modern medicine in the new millennium? *Gene Ther* **11**: 427-8.
- Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Jen Tai S, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nature genetics* **24**: 257-61.

- Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Brusco P, Kaye SB, Hong WK, Kim AH (2002). A controlled trial of ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature Med* **6**: 879-85.
- Kim D, Martuza RL, Zwiebel J (2001). Replication-selective virotherapy for cancer: biological principles, risk management and future directions. *Nature Med* **7**: 781-7.
- Kohn DB, Sadelain M, Glorioso JC (2003). Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID. *Nature Reviews* **3**:477-88.
- Kohn DB, Sadelain M, Dunbar C, Bodine D, Kiem HP, Candotti F, Tisdale J, Rivière I, Blau CA, Richard CE, Sorrentino B, Nolte J, Malech H, Brenner M, Corenta K, Cavagnaro J, High K, Glorioso J (2003). American Society of Gene Therapy *ad hoc* sub-committee on retroviral-mediated gene transfer to hematopoietic stem cells. *Mol Ther* **8**: 180.
- Kolfschoten I, Agami R (2003). Allelic gene inactivation: pinpointing the problem. *Gene Ther* **10**: 1931-2.
- Li Z, Düllmann J, Schiedlmeier B, Schmidt M, von Kalle C, Meyer J, Forster M, Stocking C, Wahlers A, Frank O, Ostertag W, Kuhlche K, Erkert HG, Fehse B, Baum C (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* **296**: 497.
- Lipps HJ, Jenke ACW, Nehlsen K, Scinteie MF, Stehle IM, Bode J (2003). Chromosome-based vectors for gene therapy **304**: 23-33.
- Lowenstein PR (2004). Immunological needles in the gene therapy haystack: applying a genetic paradigm to gene therapy. *Gene Ther* **11**: 1-3.
- Lu QL, Bou-Gharios G, Partridge TA (2003). Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. *Gene Ther* **10**: 131-42.
- Makinen K, Manninen H, Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E, Yla-Herttuala S (2002). Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol Ther* **6**: 127-33.
- Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, Tai SJ, Ragni MV, Thompson A, Ozelo M, Couto LB, Leonard DG, Johnson FA, McClelland A, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, Glader B (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101**: 2963-72.
- Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, Coen DM (1991). Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* **252**: 854-6.
- Mazda O (2002). Improvement of nonviral gene therapy by Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vectors. *Curr Gene Ther* **2**: 379-92.
- Medina MF, Kobinger GP, Rux j, Gasmi M, Looney DJ, Bates I, Wilson JM (2003). Lentiviral vectors pseudotyped with minimal filovirus envelopes increased gene transfer in murine lung. *Mol Ther* **8**: 777-89.
- Min JJ, Gambhir SS (2004). Gene therapy progress and prospects: non-invasive imaging of gene therapy in living subjects. *Gene Ther* **11**: 115-125.
- Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, Martuza RL (1995). Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* **1**:938-43.
- Mitani K, Kubo S (2002). Adenovirus as an integrating vector. *Curr Gene Ther* **2**: 135-44.

- Moolten FL, Cupples LA (1992). A model for predicting the risk of cancer consequent to retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* **3**: 479-86.
- Müllbacher A, Lobigs M (2001). Creation of killer poxvirus could have been predicted. *J Virol* **75**: 8353-5.
- McNeish IA, Bell SJ, Lemoine NR (2004). Gene therapy progress and prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes. *Gene Ther* **11**: 497-503.
- Myklebost O (2004). Putting Norway on the gene-therapy map. *Nature* **429**: 129.
- Nemunaitis J, Edelman J (2002). Selectively replicating viral vectors. *Cancer Gene Ther* **9**: 987-1000.
- Niidome T, Huang L (2002). Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* **9**: 1647-52.
- Orkin SH, Motulsky AG (1995). Report and Recommendations of the Panel to Assess the NIH Investment in Research on Gene Therapy. Verkregen van het internet: <http://www.nih.gov/od/orda/panelrep.htm>
- Ossevoort M, Visser BMJ, Van den Wollenberg DJM, Van der Voort EIH, Offringa R, Melief CJM, Toes REM, Hoeben RC (2003). Creation of immune 'stealth' genes for gene therapy through fusion with the Gly-Ala repeat of EBNA-1. *Gene Ther* **10**: 2020-8.
- Park WS, Hayafune M, Miyano-Kurosaki N, Takaky H (2003). Specific HIV-1 env gene silencing by small interfering RNAs in human peripheral blood mononuclear cells. *Gene Ther* **10**: 2046-50.
- Pearson S, Jia H, Kandachi K (2004). China approves first gene therapy. *Nature Biotechnol* **22**: 3-4.
- Raper SE, Yudkoff M, Chirmule N, Gas GP, Nunes F, Hashal ZJ, Furth EE, Probert KJ, Robinson MB, Magosin S, Simoes H, Speicher L, Hughes J, Tazelaar J, Wivel NA, Wilson JM, Batshaw ML (2002). A pilot study of *in vivo* liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gene Ther* **13**: 163-75.
- Reid T, Warren R, Kirn D (2002). Intravascular adenoviral agents in cancer patients: Lessons from clinical trials. *Cancer Gene Ther* **9**: 979-86.
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, Merino MJ, Culver K, Miller AD, Blaese RM, Anderson WF (1990). Gene transfer into humans - immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* **323**: 570-8.
- Russell SJ (2002). RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther* **9**: 961-6.
- Sanders DA (2004). Ebola virus glycoproteins: guidance devices for targeting of gene therapy vectors. *Expert Opin Biol Ther* **4**: 329-36.
- Schalk JAC, Hegger I, Jongen PMJM (2001). Gene therapeutics and DNA vaccines; quality and regulatory aspects. RIVM report 605200 001.
- Schmidt-Wolf GD, Schmidt-Wolf IGH (2003). Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. *Trends in Mol Med* **9**: 67-72.
- Shayakhmetov DM, Carlson CA, Stecher H, Li Q, Stamatoyannopoulos, Lieber A (2002). A high-capacity, capsid-modified hybrid adenovirus/adeno-associated virus vector for stable transduction of human hematopoietic cells. *J Virol* **76**: 1135-43.
- Simons M, Ware JA (2003). Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nature Rev* **2**: 1-9.
- Southam CM (1960). Present status of oncolytic virus studies. *Ann NY Acad Sci* 656-73.
- Varghese S, Rabkin SD (2002). Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther* **9**: 967-78.

- Vile R, Ando D, Kim D (2002). The oncolytic virotherapy treatment platform for cancer: Unique biological and biosafety points to consider. *Cancer Gene Ther* **9**: 1062-7.
- Williams DA, Baum C (2003). Gene therapy – new challenges ahead. *Science* **302**: 400-1.
- Simovic D, Isner JM, Ropper AH, Pieczek A, Weinberg DH (2001). Improvement in chronic ischemic neuropathy after intramuscular phVEGF165 gene transfer in patients with critical limb ischemia. *Arch Neurol* **58**: 761-8.
- Tent M (2004). Totale kosten van weesgeneesmiddelen zijn peanuts. *Pharm Weekblad* **9**; 284.
- Wang Y, Camp SM, Niwano M, Shen X, Bakowska JC, Breakefield XO, Allen PD (2002). Herpes simplex virus type 1/adeno-associated virus rep(+) hybrid amplicon vector improves the stability of transgene expression in human cells by site-specific integration. *J Virol* **76**: 7150-62.
- Wiley, J and Sons Ltd (2004). The Journal of Gene Medicine ©2004. www.wiley.co.uk/genmed/clinical/
- Zeimet AG, Marth C (2003). Why did p53 gene therapy fail in ovarian cancer? *Lancet Oncol* **4**: 415-22.

Relevante publicaties met betrekking tot genterapie in Nederland

Davids W, Quax PHA, Naaborg R (2002). Haalbaarheid centrale faciliteit voor vectorproductie. TNO rapport PG/VGZ/2000.022.

Gezondheidsraad: Commissie Genterapie, Genterapie. Rijswijk: Gezondheidsraad, 1997; publicatienr. 1997/12 ISBN 90-5549-165-9.

Haisma HJ (2004). Genetische doping. Nederlands Centrum voor Dopingsvraagstukken.

Schalk JAC, Hegger I, Jongen PMJM (2001). Gene therapeutics and DNA vaccines; quality and regulatory aspects. RIVM report 605200 001

Overzicht van afgegeven vergunningen introductie in het milieu van genetische gemodificeerde organismen ten behoeve van Nederlandse klinische genterapiestudies.

Bron: VROM website: http://www.vrom.nl/biotechnologie_online

<u>BGGO Nummer</u>	<u>Kennisgever</u>	<u>Onderwerp</u>	<u>Einddatum</u>	<u>Stand van zaken</u>
03/08	Vereniging voor christelijk hoger onderwijs, wetenschappelijk onderzoek en patientenzorg - Vrije Universiteit	adeno associated virus	-	Beschikking
03/05	Gemeentelijke Geneeskundige en Gezondheidsdienst Amsterdam	vacciniavirus	-	Van kracht
03/02	Erasmus Universitair Medisch Centrum	Staphylococcus aureus	31-12-2004	Beschikking
03/01	Academisch Ziekenhuis Leiden	adenovirus	-	Van kracht
02/02	Erasmus Universitair Medisch Centrum	adenovirus	-	Van kracht
02/01	Academisch Ziekenhuis bij de Universiteit van Amsterdam (AMC)	Lactococcus lactis	-	Van kracht
01/10	Academisch Ziekenhuis Maastricht	Salmonella typhimurium	-	Van kracht
01/09	Academisch Ziekenhuis Leiden	DNA vaccinatie	-	Van kracht
01/08	Erasmus Universitair Medisch Centrum	adeno associated virus	-	Van kracht
01/07	Academisch Ziekenhuis Leiden	adeno associated virus	-	Van kracht
01/05	Academisch Ziekenhuis Leiden	kanariepokkenvirus	-	Teruggetrokken
01/04	Academisch Medisch Centrum	adenovirus	-	Teruggetrokken
01/03	Erasmus Universitair Medisch Centrum	retrovirus	-	Van kracht
01/01	Vereniging voor Christelijk Wetenschappelijk Onderwijs, Acad. Ziekenhuis Vrije Universiteit	adenovirus	-	Van kracht
00/03	Academisch Ziekenhuis Groningen	Semlike Forest Virus	-	Van kracht
99/18	Pasteur Mérieux Connaught	kanariepokkenvirus	-	Teruggetrokken
99/15	Erasmus Universitair Medisch Centrum	adenovirus	-	Van kracht
99/12	Academisch Ziekenhuis Groningen	DNA vaccinatie	-	Van kracht
99/10	Academisch Ziekenhuis Groningen	DNA vaccinatie	-	Van kracht
98/07	Erasmus Universitair Medisch Centrum	adenovirus	-	Teruggetrokken
97/20	Universitair Medisch Centrum Utrecht	humane cellen	-	Van kracht
97/14	Erasmus Universitair Medisch Centrum	humane cellen	-	Van kracht
97/09	Cantab Pharmaceutical Research Limited	vacciniavirus	-	Teruggetrokken
97/05	Pasteur Mérieux Connaught	kanariepokkenvirus	-	Teruggetrokken
97/01	Academisch Ziekenhuis Leiden	cholera	-	Teruggetrokken
96/27	Aventis Pharma	adenovirus	-	Teruggetrokken
96/08	Academisch Ziekenhuis Leiden	adenovirus	-	Teruggetrokken
96/07	Academisch Ziekenhuis Groningen	adenovirus	-	Van kracht
95/15	Academisch Ziekenhuis Leiden	humane cellen	-	Teruggetrokken
95/14	Crucell Holland B.V.	adenovirus	-	Teruggetrokken
95/10	Academisch Ziekenhuis Groningen	kanariepokkenvirus	-	Van kracht
95/04	Academisch Ziekenhuis Groningen	humane cellen	-	Van kracht
93/08	Crucell Holland B.V.	retrovirus	-	Teruggetrokken
91/08	Crucell Holland B.V.	humane cellen	-	Teruggetrokken

Regulatoire reacties in Europa en de Verenigde Staten op het ontstaan van leukemie bij X-SCID patiënten

Bron: Cavazzana-Calvo *et al.*, 2004.

Duitsland

Na een tijdelijke stopzetting van alle studies met retrovirale vectoren, zijn in februari 2003 alle genterapiestudies voor SCID en andere ziekten opnieuw gestart.

www.bundesaerztekammer.de/30/Ethik/80Themen/85KomSomGen

Italië

Er is een moratorium van kracht voor elke klinische studies waarbij retrovirussen worden gebruikt tot 31 december 2003. Nieuwe regelgeving wordt verwacht.

www.iss.it/sitp/scf1/comu/index.html

Frankrijk

Na een tijdelijke stopzetting, zijn klinische studies voor X-SCID in januari 2004 weer heropend.

afssaps.sante.fr

Nederland

Er liepen geen klinische SCID studies meer.

Verenigd Koninkrijk

Goedgekeurde klinische SCID studies worden op individuele basis beoordeeld en gaan in principe door.

www.doh.gov.uk/gentics/gtax/recommendationsGTAC-CSM.PDF

Europa

Er is geen Europese regelgeving. Ofschoon experts verdedigen dat stamcelgenterapiestudies zouden moeten zijn toegestaan voor levensbedreigende ziekten na zorgvuldige evaluatie van risico's en therapeutisch nut.

www.emea.eu.int/inex/indexh1.htm

Verenigde Staten

De FDA staat genterapie studies voor X-SCID toe indien geen andere therapie beschikbaar is. Van het stopzetten van andere stamcelgenterapieën kan op individuele basis worden afgeweken.

www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/minutes/3924M2.doc